

別記様式第3号(第4の2関係) (終了時)

研 究 成 果 報 告 書

平成31年4月26日

内閣府食品安全委員会事務局長 殿

(代表受託者)

神奈川県秦野市落合729番地の5

一般財団法人食品薬品安全センター

代表理事 小島 幸一



平成28～30年度食品健康影響評価技術研究「課題名：発生毒性試験における胎児形態異常に関するデータ収集と骨格変異の毒性学的意義に関する研究：フルシトシン誘発性過剰肋骨の発現機序からの考察（課題番号：1607）」

委託契約総額 30,309,700 円

上記委託研究について、食品安全委員会食品健康影響評価技術研究実施要領（平成17年5月18日食品安全委員会事務局長決定）第4の2の規定に基づき、別紙のとおり研究成果報告書を提出します。

平成 28～30 年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

（※研究全体の期間（初年度及び2年目以降）について記載する。）

研究課題名 (研究項目名)	課題名：発生毒性試験における胎児形態異常に関するデータ収集と骨格変異の毒性学的意義に関する研究:フルシトシン誘発性過剰肋骨の発現機序からの考察（課題番号：1607） (4 その他(2) その他食品健康影響評価に資する研究・調査)
主任研究者	研究者名：桑形 麻樹子 所属機関：（一財）食品薬品安全センター秦野研究所

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成 28 年度～平成 30 年度（3 年間）

2 研究目的

食品のリスク評価では、生殖発生毒性試験における胎児骨格変異（自然発生的にも認められ、個体の生存に悪影響を及ぼさない変化）発現率の有意な増加が無毒性量判断の根拠とされないことがある。しかし、ヒトでは変異による臨床症状が観察されることもあり、リスク評価における骨格変異の意義を明らかにすることは重要である。

一方、遺伝子解析分野における遺伝子変異データデジタル化に伴い、動物の発生用語の統一や表現型をコード化する国際標準化が進んでいる。異常及び変異の分類も整理されつつあることから、今後、変異の意義については議論されることは必須である。

本研究では、リスク評価時に有用となるラット生殖発生毒性試験の背景データを収集するとともに、自然発生性にしばしば認められる代表的な骨格変異である過剰肋骨に注目し、薬剤誘発性の過剰肋骨の発現機序を探る。げっ歯類の発生毒性試験における投与開始時期は、同一母体内および腹間での各胎児の発生段階が顕著に異なっている時期である。こうした各胎児の発達の違いが化学物質に対する影響に差をもたらすことも考慮に入れて結果を評価する。また、生後に過剰肋骨の形態がどのように変化していくのかを確認するために、動物用マイクロCT撮影装置を用いて同一個体における生後観察を経時的に実施し、背景データの結果も併せて、過剰肋骨の毒性学的意義を考察することを最終目的とする。

薬剤誘発による過剰肋骨の陽性対照物質として、経口抗真菌剤で催奇形性物質であるフルシトシン (5-FC) を選択する。5-FCをラットの妊娠9日に単回経口投与することにより胎児に過剰肋骨が認められることが報告されている（堀本ら、2016年JSOT発表）。最終肋骨の決定は、体節性統御関連遺伝子により統御されている。我々は、体節性決定遺伝子である*Hox*遺伝子の発現に着目し、5-FC投与により胎児に認められる骨格変化と体節性決定因子の発現との関係を明らかにし、5-FC誘発性の過剰肋骨発現機序解明を試みる。

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。）

3-1. 平成 28 および 29 年度の研究体制

研究体制		
担当	氏名	役割
研究代表者	桑形麻樹子	研究の統括、動物実験、データの解析
1. 発生毒性試験における胎児観察背景データ収集		
(研究協力者)	データ解析コアメンバー	
	江馬誠（産総研）、堀本政夫（千葉科学大学）、藤原道夫（アステラス製薬（株））、峯島浩（エーザイ（株））、西沢紫乃（帝人ファーマ（株））	
2. 抗菌剤フルシトシン投与による過剰肋骨の発現機序解明		
分担研究者	熊本隆之（奥羽大・薬）	RT-PCR 手法を用いた遺伝子解析発現
(研究協力者)	今井元（奥羽大・歯） 鈴木礼子（奥羽大・歯） 堀本政夫（千葉科学大学） 小川哲郎（埼玉医大・生理）	Whole mount in situ hybridization 法を用いた遺伝子発現 フルシトシン投与後の胎児形態観察(病理組織・免疫組織)

3-2. 平成30年度の研究体制

担当	氏名	役割
研究代表者	桑形麻樹子	研究の統括、動物実験（生後観察実験）、データの解析、背景データ見直し、総合評価
研究協力者	熊谷文明、瀬沼美華、等々力舞（秦野研究所・安全性評価）	動物実験（生後観察実験）、データの解析
	熊本孝之（奥羽大・薬）	遺伝子発現解析まとめ（実験はH29年度までに終了）、総合評価
	小川哲郎（埼玉医大・生理）	胎児形態観察（病理組織、免疫染色）、背景データ見直し、総合評価
	堀本政夫（千葉科学大）	背景データ見直し、総合評価

4 倫理面への配慮について

本研究課題では実験動物を用いた研究を行うが、食品薬品安全センター動物実験委員会の機関承認を取得し、「食品薬品安全センター動物実験実施指針」に基づき行われた。奥羽大学において動物実験を実施する場合も大学の機関承認を得て指針に基づき実施した。また、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」や「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に基づき実施し、動物実験を行う際は、動物の痛みの軽減など含めて生命倫理にも十分配慮して動物実験を行った。

II 研究内容及び成果等

(1) 研究項目名：発生毒性試験における胎児観察背景データ収集

1) 平成 28-29 年度に実施した背景データ収集 (担当：桑形麻樹子およびコアメンバー)

日本先天異常学会にて開催している胎児観察用語委員会に参画している国内各企業および受託機関に協力を依頼し、2011-2015 年のラット生殖発生毒性試験（催奇形性試験）における背景データを収集した。24 機関（製薬企業 15 社、受託機関 9 社）から提出されたデータのラットの系統は SD (CrI:CD(SD))系と Wistar Hannover 系の 2 系統であった。このうち Wistar Hannover は、RccHannTM:WIST および BrHanWIST@Jcl(GALAS)の 2 亜種に分けられた。

帝王切開所見、外表、内臓、骨格（異常・変異）を系統ごとに集計した。なお、内臓観察は一部の施設にて異常および変異に分類して評価していたが、いずれの所見においても施設間差が認められたことから、分類せずに集計した。

1-2. 結果及び考察

収集した結果、発現頻度に施設間差が認められた。この一因として、所見名や定義の違い、異常と変異の分類の違いに起因した差と考えられた。1994-2010 年の背景データをまとめた既報(Emm et al., 2015)と比較した結果、発現頻度が顕著に異なった所見は、大きさ（矮小、小耳、小眼、短尾、痕跡尾）や程度（腎盂あるいは尿管拡張、尿管蛇行、胸腺頸部遺残、肝臓分葉異常）を示す所見、識別が難しい所見（臍ヘルニアと臍帯ヘルニア）であった。

従って、所見の取り方および異常と変異の分類の差は観察されたが、既報と比較して、ある特定の形態変化が増減していることはなかった。

詳細結果は、投稿された論文およびサプリメントデータを参照 (Kuwagata, M et al., 2018)。

2) 平成30年度に実施した過剰肋骨に特化した追加背景データ収集 (研究担当者名：桑形麻樹子、堀本政夫、小川哲郎)

通常、ラット発生毒性試験では器官形成期に化学物質を連続投与して、催奇形性の有無を評価する。従って、化学物質の連投投与により、発生段階に依存して次々と発現してくる各Hox遺伝子の発現が変化することが予想される。我々は、自然発生性の過剰肋骨は単独発現であり、薬剤誘発性の過剰肋骨は他の形態異常も併発していると仮説を立てた。

本事業で収集した「2011-2015年に実施したラット発生毒性試験の胎児観察背景データ」は、一腹単位の所見ごとに集計されたデータである。過剰肋骨が認められた胎児に他の骨格変化が認められたか否かは、各施設において生データを確認しないと検証ができない。本事業の必要性を理解してもらうために全体会議を2018年6月27日に開催し(東京於)、これまでの経過報告をするとともに、背景データの見直し事業への参加を依頼した。その結果、背景データ収集事業に参加した24施設中22施設（製薬企業13社、受託機関9社）が参加を承諾した。不参加の2施設のうち、一施設は組織改正により継続不可、他の一施設は該当データがないことから不参加という理由であった。

所見名は先行した背景データ集に従い収集した。

2-1. SD系ラット (添付資料1-1)

20施設から過剰肋骨を呈した胎児248匹のデータが提出された。過剰肋骨と、頭部、頸椎、胸椎、腰椎、仙椎、尾椎、椎骨、肋骨、胸骨、四帯（四肢と脊柱を連結する骨の総称）に変化が併発していた。以下に併発変化数および胎児数を示す。

併発異常（変異）数	胎児数
0（過剰肋骨のみ）	15
1	178
2	34
3	12
4	7
5	2
合計	248

過剰肋骨と別の1つの異常（変異）を伴った胎児が178胎児と一番多かった。また、全胎児の約5%の胎児（n=12以上）に認められた併発していた変化は、舌骨骨化不全(12)、胸椎椎体二分骨化(24)、胸椎椎体ダンベル状骨化(45)、腰椎椎体過剰(13)、仙椎前総椎骨増加(13)、肋軟骨不連続(13)*、胸骨分節骨化不全(73)*、胸骨分節非対称骨化(14)*だった。カッコ内は観察胎児数、*は一施設でのみ観察された所見を示す。

2-2. Wistar Hannover系ラット (添付資料1-2)

過剰肋骨を呈した胎児は、RccHanTM:WIST 亜種は4施設から46胎児、BrHan:WIST@Jcl(GALAS) 亜種は3施設から343胎児であった。

以下に併発変化数および胎児数を示す。両亜種ともに過剰肋骨と別の1つの異常（変異）を伴った胎児が一番多かった。

併発異常（変異）数	胎児数	
	RccHanTM:WIST	BrHan:WIST@Jcl(GALAS)
0（過剰肋骨のみ）	0	0
1	32	276
2	12	63
3	1	3
4	1	1
合計	46	343

RccHanTM:WISTでは、頭部、胸椎、腰椎、仙椎、尾椎、椎骨、肋骨、胸骨、四肢に変化が併発していた。また、全胎児の約5%の胎児（n=2以上）に認められた併発していた変化は、頭頂間骨骨化不全(3)、頭頂骨骨化不全(5)、胸椎椎体二分骨化(2)、腰椎椎体数増加(7)*、仙椎前総椎骨数増加(3)、波状肋骨(2)、胸骨分節非対称骨化(4)、胸骨分節骨化不全(25)、中

指骨骨化不全(5)だった。カッコ内は観察胎児数、*は一施設でのみ観察された所見を示す。

BrHan:WIST@Jcl(GALAS)では、頭部、肩甲骨、頸椎、胸椎、腰椎、仙椎、尾椎、椎骨、肋骨、胸骨、四肢に変化が併発していた。また、全胎児の約5%の胎児 (n=14以上) に認められた併発していた変化は、頬骨と上顎骨癒合(14)*、腰仙椎移行 (第7番目の腰椎椎弓の向きが左右で異なる) (51)*、肋軟骨不連続(184)*、仙椎前総椎骨数増加(104)だった。カッコ内は観察胎児数、*は一施設でのみ観察された所見を示す。

2-3. 考察及び課題

得られた結果から、過剰肋骨単発で発現した胎児よりも、別の異常 (変異) を1つ併発した胎児が系統に関係なく多かった。併発していた変化は、骨化不全の所見が多かった。また椎骨数増加を示唆する腰椎椎体増加および仙椎前総椎骨数増加も併発して認められた。

我々が予測した自然発生性と薬剤誘発性の過剰肋骨の発現パターンの違い (自然発生性は単発発現、薬剤誘発性は複合発現という仮説) とは異なっていた。今後は、既報の催奇形性物質のデータを精査し、併発パターンとの相違を比較していく必要があると考えられた。しかし、今回の結果は、薬剤誘発性と自然発生性とを区別する有用な基礎データになったと考えられる。リスク評価の際に、児に併発する形態異常 (変異) パターンを精査することで (例えば、薬剤誘発性では自然発生では発現しにくい指の奇形が認められるなど)、ある程度の区別はできるのではないかと考えられた。

表現型のみから判断する場合には、他のパラメーターと合わせて慎重に評価をすることが重要である。実施施設および使用動物の背景データは、有用な補助データになると考えられた。

(2) 研究項目名：抗真菌剤フルシトシン投与による過剰肋骨の発現機序解明
(研究担当者名：熊本隆之、今井 元、鈴木礼子、小川哲郎、桑形麻樹子)

研究成果：

1) 遺伝子解析予備検討-1 (投与時間の決定、担当；桑形、小川)

今回注目した *Hox* 遺伝子は時期特異的に椎骨形成から四肢の骨格形成まで幅広く機能する因子である。5-FC 投与により時期特異的に胎児に発現する体節性決定因子の発現異常が起こり、胎児の形態異常を発現させると仮説を立てた。この仮説を検証するためにラット妊娠9日投与による過剰肋骨発現、あるいは妊娠13日投与により四肢の骨格異常形成とそれぞれに対応する *Hox* 遺伝子の発現パターンを比較検討することで、5-FC 投与による形態異常発現の機序解明を試みた。

1-1. ラット妊娠9日の一腹内の胚の発生 (投与日)

投与時期の同腹内および腹間の胚の発達個体差を確認した。

即ち、SD系ラットの妊娠9日 (膣栓確認日=妊娠0日) に、7時、13時および19時にそれぞれ帝王切開して全ての胚を摘出した。各ポイント2-3腹の母動物を配し、腹間の胚の発生段階も併せて確認した。その結果、腹内および腹間に各胚の発生段階にばらつきがあることが確認された (図表1)。

なお、本課題では、妊娠動物を購入(妊娠4-6日の動物を入荷)し、実験に配した。

1-2. ラット妊娠9日の5-FC投与実験 (過剰肋骨発現の確認)

堀本らの既報 (2016年日本毒性学会発表、投与時刻13時) の再現性の確認および投与時期の胚の発達段階の違いによる感受性を調べるために、妊娠9日に5-FCを0 (媒体、0.5% CMC-Na) あるいは75 mg/kg を7時、13時あるいは19時に単回経口投与し (5 mL/kg)、妊娠20日に帝王切開して胚・胎児の発達への影響および過剰肋骨の発現頻度を確認した。その結果、5-FC投与により、妊娠維持および胎児発達への影響は認められなかった (図表2)。

全ての生存胎児について、アリザリン赤・アルシアン青胎児骨格二重染色標本作製し、骨格への影響を観察した。いずれの群においても過剰肋骨が発現し、既報の再現性が確認された。特に7時投与群に、過剰肋骨の発現が高頻度に認められた。

なお、本研究では、過剰肋骨は痕跡、短小 (13Rの半分以下の長さ)、完全 (13Rの半分以上の長さ) の三段階に分類して発現頻度を調べた。過剰肋骨以外では、環椎 (第一頸椎) の小型化、頸椎椎弓の軟骨部癒合、椎骨数の過剰といった骨格異常が観察された。これらの変化は朝7時投与群で高頻度に観察された (図表3、4)。

1-3. ラット妊娠13日の5-FC投与実験 (四指異常発現の確認)

ラット妊娠13日の8時、12時あるいは16時に75 mg/kgの5-FCを単回経口投与し、妊娠20日に帝王切開して胎児発達への影響を確認した。その結果、胚致死作用はなかったが、8時投与群では胎児体重および胎盤重量が僅かに低値を示した。全ての生存胎児について、アリザリン赤・アルシアン青胎児骨格二重染色標本作製し、骨格への影響を観察した。その結果、8時投与群において顕著に骨格異常が発現した。特に後肢の四指の異

常（欠損、短小、薄細）および尾椎の癒合に有意差がみられた(図表 5、6、7)。

1-4. 遺伝子解析実験の投与時間の決定

上記、1-2.および 1-3.の結果から、5-FC のラット妊娠 9 日の 7 時投与により過剰肋骨が、妊娠 13 日の 8 時投与により後肢の四指の異常が、胎児に高頻度に誘発されることを確認した。これらの形態異常が、投与時期に依存した *Hox* 遺伝子の発現異常（発現量や分布）に起因していることを証明するために、遺伝子解析実験では、5-FC による影響が顕著に認められた投与条件、即ち、妊娠 9 日投与では 7 時に、妊娠 13 日投与では 8 時に、それぞれ単回経口投与を行うこととした。

胎児のサンプリングは、これまでの結果と文献調査により、いずれの投与実験においても妊娠 13 日の 14 時に帝王切開をして胎児サンプルを得る実験計画をたてた。

本計画では動物実験は研究代表者施設(食薬：神奈川)にて行い、遺伝子解析は分担研究者施設（奥羽大：福島）で実施した。事前に胎児サンプルの輸送検討も行い、輸送による胎児サンプルへの影響はないことを確認している。

2) 遺伝子解析予備検討-2（遺伝子解析条件設定、担当：熊本、今井、鈴木）

2-1. H28 年度

分担研究者組織において妊娠 9.5、10.5、11.5、12.5、13.5 日胎児を比較検討することで適した解析日時を定めた。また、RNA 抽出および遺伝子発現定量法を構築し、候補となる *Hox* 群の *Hoxa9,b9,c9,d9,a10,c10,d10* の比較検討を行い、対象の絞り込み(*Hoxa9,a10*)を行った（妊娠 9.5 日＝妊娠 9 日の午後サンプリング胎児）。

2-2. H29 年度

検討遺伝子配列を含む cDNA クローンに T7/T3 プロモーターを配列に含んだプライマーを用い PCR 増幅して DNA template を作成し、それを基にプローブを合成した。軟骨原基に発現する *Sox9* の検出を WISH 法で行い、リアルタイム PCR 解析に用いる切断部位の微細検討を行った。その結果、過剰肋骨発現部位の 3-somite 分の前後をそれぞれ切り出し解析することで、検出能が向上することを見出した。また、WISH 法による *Hox* 遺伝子の解析は、妊娠 12 日以降では解析が難しいことから、本実験においては妊娠 11 日の胎児で *Hox* 遺伝子の発現分布を確認することにした。

3) 遺伝子解析本実験

3-1. 動物実験(担当：桑形、小川)

妊娠 9 日の 7 時(G9 投与群)あるいは妊娠 13 日の 8 時 (G13 投与群) に 75 mg/kg (5 mL/kg)の 5-FC を単回経口投与し、妊娠 13 日の 14 時 (G13.5 と定義) に帝王切開をして胎児を得た。各腹の胎児は無作為に約 3 等分し、各腹約 1/3 の胎児を遺伝子解析用の胎児に配した。対照群には 0.5%CMC-Na 溶液を投与し、同様に胎児を各解析に配した。

なお、WISH 用には G9 投与群のみ実施した。*HOX* 遺伝子発現パターン解析は妊娠 11 日の午後 2 時に帝王切開した胎児 (G11.5 と定義) を用いた。

以下に使用した母動物数、群構成を示す。

群構成

	対照群	G9 投与群	G13 投与群
母動物数 (合計)	17	15	12
G9 投与 G13.5 解剖	14	12	12
G9 投与 G11.5 解剖	3	3	NE

NE:実施せず

3-2. 遺伝子発現解析 (リアルタイム PCR 法および WISH 法、担当：熊本、今井、鈴木)

1. G9 投与実験

実体顕微鏡下で G13.5 胎児の目的部位(胸椎腰椎境界部にて体節 3 コずつ)を切り出し、RNA 抽出、逆転写を行った後、リアルタイム PCR 法にて *Hoxa9* および *Hoxa10* の遺伝子発現変動の解析を行った。

その結果、*Hoxa9* および *Hoxa10* は、対照群および 5-FC 群ともに胸椎部より腰椎部に多く発現し、対照群では有意差がみられた。しかし、5-FC 投与群では対照群と比較して顕著な領域差はなかった。また、5-FC 群の胸椎における *Hoxa10* の発現量が対照群と比較して有意に低値を示した (図表 8A, 8C)。また、*Hoxa9* および *Hoxa10* について、胸椎部発現量に対する腰椎部発現量の比を算出した結果、*Hoxa9* には腰椎部/胸椎部比に両群にて差はなかったが、*Hoxa10* の腰椎部/胸椎部比は 5-FC 群にて有意に高かった (図表 8B, 8D)。

Hox は前後軸統御を行う因子であり、*Hoxa10* は胸椎と腰椎の境目より後方に出現し、腰椎の胸椎化と肋骨形成を抑制する因子である。得られた結果から、5-FC 投与により *Hoxa10* 発現の後方化が確認された。この変化が過剰肋骨形成の機序の一端であることが考えられた。

また、*Hoxa10* の下流に存在し通常は *Hoxa10* により抑制されており、肋骨形成を担う役割を持つ *Myf5* (Myogenic regulatory factor 5)を解析したところ、腰椎側で有意な増加を認めた。これは *Hoxa10* 発現の後方化を裏付ける結果であった。

WISH 法により 5-FC 投与による *Hox* 遺伝子の発現位置の変化の解析を試みたが、一貫した結果は得られなかった。

2. G13 投与実験

実体顕微鏡下で G13.5 胎児の後肢を切断、RNA 抽出、逆転写を行いリアルタイム PCR による解析を行った。まず *Hox* 群として、四肢の発育との関連性が明確である *Hoxa11, a13, d12, d13* を解析した。その結果、5-FC 群では、*Hoxa11, a13, d12, d13* ともに有意な減少が認められた。*Hox11-13* はいずれも中足骨～指骨の特に先端方向の形成と前後軸形成を司る因子であり、妊娠 13 日の 5-FC 投与による四指異常の機序の一端であることが示された (図表 9)。

また、投与日である妊娠 13 日はラット四肢の血管新生が始まっている発生時期であることから、*Hox* 遺伝子発現変化に加え、5-FC の直接的な作用が四指形態異常に影響を及ぼしている可能性が考えられた。5-FC がフッ化ピリルジン化合物であることから、5-FC

投与後の胎児四肢における細胞周期および細胞死マーカーへの影響を解析した。測定対象は *Ccn* (*Cyclin*) *a1*, *a2*, *b1*, *d1*, *e1* および *Pcna* (*Proliferating cellular nuclear antigen*) とした。その結果、*Pcna*, *Ccnd1*, *Ccne1* の有意な増加に対し、*Ccna1*, *Ccna2*, *Ccnb1* の有意な減少を認めた。*Pcna* は細胞増殖、*Ccna1,2* は S 期・G2 期～M 期、*Ccnb1* は G2 期～M 期、*Ccne1* および *Ccnd1* は G1 期～S 期にわたってのチェックポイントを示すマーカーであることから、5-FC 投与により肢芽細胞の細胞周期が S 期にて停止し (G2 期に行かない状態) DNA 合成阻害状態であることが考えられた (図表 10)。

3-3.胎児組織学的観察 (担当:小川、桑形)

5-FC による DNA 合成阻害を確認するために、分裂細胞の M 期が標的細胞であるリン酸化ヒストン 3 蛋白の組織内分布を確認した。

G13 投与実験の G13.5 胎児の後肢を切り出し、10%リン酸緩衝ホルマリン液に固定後、ゼラチン包埋ブロックを作製し、ピプラトームにて Limb bud に対して水平面に連続薄切切片を得た。リン酸化ヒストン 3 免疫組織染色を実施し、Limb bud 最大面積薄切面の 2 連続切片から 4 か所について単位面積当たりの陽性細胞数を算出した。その結果、5-FC 投与群の肢芽部の陽性細胞は対照群と比較して顕著に減少していた。これは、上述の細胞周期および細胞増殖マーカーの結果を支持する結果であった(図表 11)。

したがって、妊娠 13 日投与による四肢の異常は、*Hox* 群の変動を介した影響 (間接的影響) に加え、DNA 合成阻害 (直接的影響) も考慮する必要があると考えられた。

4) 考察

得られた結果は、発生の初期に働く *Hox10* と、遅い時期に働く *Hox11-13* に異なる変動を見出している。ホメオボックスは時間的共線性を空間的共線性に置き換える、すなわち、1 番から 13 番まで順々に発現して個体構造を決定していることを考えると、5-FC の投与日に (G9 あるいは G13) 生体に発現している各 *Hox* 群に影響を及ぼしていることが考えられた。即ち、妊娠 9 日投与であれば *Hox9-10* を介して過剰肋骨に示される胸椎～腰椎に影響し、より遅ければ腰椎以降、さらに遅い妊娠 13 日投与であれば *Hox11-13* を介して四肢形成に影響が及ぶことを示している。

本実験の結果、5-FC 投与による過剰肋骨は、*Hoxa10* 発現の尾方化により、胸椎・腰椎境界部が尾方にずれ込み、第 14 番目の肋骨が発生したと考えられた。

今回の結果は投与 4 日後での評価である。従って、妊娠 9 日の投与の時点で、後に *Hox* 遺伝子発現を変動させる因子を解明することが今後の課題である。直接的な機序を解明により、薬剤誘発性と自然発生性の区別が明確になることが期待される。

(3) 研究項目名：同一個体における過剰肋骨の生後観察（担当；桑形、熊谷、瀬沼、等々力）

過剰肋骨が、生後発育とともにどのように変化していくかを確認することは、過剰肋骨の毒性学的意義を論じる上で重要である。本課題にて陽性対照である 5-FC を用いて、妊娠 9 日に経口投与し、自然分娩させて得られたラット出生児の過剰肋骨の形態推移を、動物用 CT 装置を用いて生後 9 週（生後 60-61 日）まで経時的に観察し、同一個体における過剰肋骨の形態推移を確認した。

使用動物の系統の変更

前述の「(2) 研究項目名：抗真菌剤フルシトシン投与による過剰肋骨の発現機序解明」では、堀本らの既報に基づき、Slc:SD ラットを用いて検討したが、本研究項目「(3) 研究項目名：同一個体における過剰肋骨の生後観察」においては、CrI:CD(SD)ラットを用いた。同じ SD 系ラットではあるが、ブリーダーが異なる。

変更理由：実験施設（秦野研究所）における分娩および出生児の背景データがある CrI:CD(SD)ラットを使用した。

なお、両系統ともに 5-FC 投与により胎児に過剰肋骨を誘発することは確認している。CrI:CD(SD)ラットを用いた際の帝王切開所見および胎児骨格観察結果は、図表 56, 57 に記した。

1) 実験方法

実験動物用 3D マイクロ X 線 CT (CosmoScan GXII, 株式会社リガク) を用いて、同一個体の過剰肋骨の形態推移を生後 4 日から 60 日まで観察した。過剰肋骨を誘発させる陽性対照化学物質として経口抗真菌薬フルシトシン (5-flucytocine, 5-FC) を用いた。

平成 28 および 29 年度に実施した 5-FC ラット妊娠 9 日単回投与実験計画および堀本らによる実験報告に基づき、SD 系ラットの妊娠 9 日の朝 7 時に 35 あるいは 75 mg/kg の 5-FC を単回経口投与後、自然分娩させて出生児を得た。分娩日を生後 0 日とし、生後 4 日に一腹当たりの哺育児数を 8 匹（原則雌雄各 4 匹）に調整し、生後 21 日に離乳した。生後 21 日から実験終了日（生後 61-63 日）まで、同姓同腹 2 匹/ケージにて実験終了時まで飼育した。

2) 用量設定理由および Trial 1~3 の位置づけ

CT 装置レンタル期間が限られていたため、予備的検討を実施することが困難であったため、5-FC 投与による分娩状態および生後観察を検討せずに既報情報のみで動物実験を開始した。そのため 5-FC 投与量の公比が 2 と通常の動物実験よりも狭い。また、全体の動物実験の規模から 2 用量以上の群設定は困難であった。

実験開始時、生後に過剰肋骨の性状（長さ等）が変わるとすれば、身体的発達が顕著である離乳前に起こるのではないかと考えた。また、動物実験が進行するにつれ、追加の撮影ポイントや検討項目が出てくることを推定し、X 線暴露量を考慮して、動物実験を 3 パートに分け、さらに動物実験実施時期を 1-2 週間ずらして実施した。

Trial-1：生後60日（雌は61日）まで観察する群（主実験）

Trial-2：生後21日まで観察する群。生後3週間に過剰肋骨が伸長することを推定し、X線曝露回数を増やした。

Trial-3：Trial-1を補完するための群。性成熟前後にて過剰肋骨が伸長したときの補強として、性成熟前後のX線曝露回数を増やした。

群構成およびCT実施時期を下記に記す。

Trial-1: 群構成(生後9週まで飼育)

群	母動物数	観察児数	CT撮影(生後:P)	X線総曝露量
1.対照群(0.5%CMC-Na)	9	72匹(雄36匹、雌36匹)	雄(6回)：P4, P14, P26, P35, P53, P61	雄:約72.6 mGy
2. 5-FC 低用量群 (5FC-L: 35 mg/kg)	9	72匹(雄36匹、雌36匹)		
3. 5-FC 高用量群 (5FC-H: 75 mg/kg)	9 a)	64匹(雄34匹、雌30匹)	雌(5回)：P4, P14, P26, P42, P61	雌:約60.5 mGy

a) 1例不妊であったためにN=8となった。

Trial-2: 群構成(生後3週まで飼育)

群	母動物数	観察児数	CT撮影(生後:P)	X線総曝露量
1.対照群(0.5%CMC-Na)	3	24匹(雄12匹、雌12匹)	雌雄(5回)：P4, P7, P11, P16, P21	約60.5 mGy
2. 5-FC 低用量群 (5FC-L: 35 mg/kg)	6	48匹(雄24匹、雌24匹)		
3. 5-FC 高用量群 (5FC-H: 75 mg/kg)	6	48匹(雄25匹、雌23匹)		

Trial-3: 群構成(生後9週まで飼育, Trial-1を補強する群)

群	母動物数	観察児数	CT撮影(生後:P)	X線総曝露量
1.対照群(0.5%CM-Na)	3	無処置動物 c) 24匹(雄12匹、雌12匹)	雌雄(8回)：P4, P9, P11, P13, P15, P26, P57, P63 (or P64)	約96.8 mGy
2. 5-FC 低用量群 (5FC-L: 35 mg/kg)	5	40匹(雄20匹、雌20匹)		
3. 5-FC 高用量群 (5FC-H: 75 mg/kg)	5 b)	32匹(雄17匹、雌15匹)		

b) 一腹において産児数が2匹であり、生後4日には1匹不明となったために生後5日に母児ともに解剖した。

c) X線非照射(無処置)群にした。出生児を2等分し、半数は離乳時に、残りは最終解剖時に解剖し、血液学的検査に配した。

3) 観察項目(出生児)

3-1. 体重測定：生後0日から解剖時まで、週1回、測定した。

3-2. 性成熟：雌は陰開口および雄は包皮分離の完成日を確認し、その日の体重を測定した。

3-3. 解剖：生後9週(Trial 1および3)あるいは生後3週(Trial 2)に解剖した。その際、一部の動物について器官重量を測定し、病理組織学的検査用に保存した。また、代表例について採血し、血液学的検査を実施した。

- 3-4. 器官重量：各群、各腹雌雄各2例を無作為に選抜し、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子宮重量を測定した。
- 3-5. 病理組織学検査：各群、雌雄各1例を無作為に選抜し、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、子宮、卵巣、腔、大腿骨（骨髄）について、パラフィン包埋HE染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。
- 3-6. 血液学検査：無処置動物（X線非照射動物）および照射対照群の各10例について、血液学検査を実施し、CT撮影による造血系に対する影響を確認した。

4. CT撮影

- 4-1. 使用機器：実験動物用3DマイクロX線CT (CosmoScan GXII, 株式会社リガク)
- 4-2. CT撮影日：上表参照。
- 4-3. 撮影：イソフルラン吸入麻酔下にてX線照射し、CT撮影をした(図表12)。
生後4日に全ての生存児についてCT撮影を行い、過剰肋骨を有する児を優先的に選抜し、一腹当たりの哺育児数を、原則、雌雄各4匹、合計8匹に調整した。過剰肋骨は、痕跡型、短小型（第13肋骨の長さの半分以下）、完全型（第13肋骨の長さの半分以上）に分類した。残りの出生児はすべて骨格標本を作製した。

5. 骨格観察

生後4日剖検児、試験終了時剖検児のうち過剰肋骨を呈した出生児の一部について、CT画像との整合性を確認するために、骨格二重染色標本を作製し、骨格観察を行った。

6. 結果

動物実験は2018年5月から8月に実施し、計画通りに終了した。過剰肋骨は異常な伸長を示さなかったために、Trial-1について、以降、報告をする。

母動物体重、出産率、生児数、哺育状態、児の生存率に5-FC投与による影響はなかった(図表13)。死亡児の骨格観察（5FC-L群：1例、5-FC-H群：4例）では、過剰肋骨が4例に認められ、そのうち3例で過剰肋骨と腰椎の癒合が観察された。そのほか、胸椎椎体あるいは胸骨分節の二分骨化が観察された。

雌雄出生児ともに、生後体重は対照群と同様に推移した(図表14, 15)。

性成熟完成日は、雌雄ともに、5-FC投与による影響はなかった(図表16)。

また、出生児体重を過剰肋骨の有無により分けて集計した結果、過剰肋骨の有無により体重に影響はなかった(図表17, 18, 19, 20)。

剖検時の血液学的検査の結果、本CT撮影条件下では造血系に影響はなかった(図表21)。

器官重量の結果、雄の副腎比体重値が対照群と比較して高値を示した。これは、器官重量測定用に選抜した動物の解剖体重が大きいことに起因した変化と考えられた。雌では対照群と比較して差はなかった(図表22, 23)。

病理組織学検査の結果、対照群を含む各群に肝臓、脾臓、腎臓に所見がみられたが、対照群と同程度の変化であり、5-FC投与により病理組織学的変化はなかったと判断した。

7. CT解析

CTデータから、(1) 3D画像および(2) MIP (maximum intensity projection) 画像を作成し、形態観察および肋骨計測を行った(図表24)。

本実験の特徴は、同一個体の肋骨の発達を経時的に追跡したことである。代表例として、過剰肋骨を有する児（左側に完全型、右側に短小型の過剰肋骨を有する5FC-H群の雌出生児）の生後4日から生後61日まで過剰肋骨について3D画像を図表25に、MIP画像からの解析結果を図表26に示す。

3D画像から過剰肋骨の形態推移を観察し、MIP画像から第13肋骨長および過剰肋骨（第14肋骨）長を測定し、その比率（第13肋骨に対する過剰肋骨の割合）を算出して長さの推移および伸長の程度を確認した。青いカラム（白黒では濃色）は第13肋骨の長さ、オレンジのカラム（白黒では淡色）は過剰肋骨（第14肋骨）の生後4日から61日までの長さを示す。成長に伴い肋骨の長さも伸長した。しかし、第13肋骨の長さに対する過剰肋骨の長さの比（折れ線グラフ）は変化がなかった。すなわち、過剰肋骨は、生後に過度に伸長しないことがわかった。また、性成熟の前後により過剰肋骨の伸長度が変わるといった変化もなかった（図表26）。

全ての出生児について、同様の解析を行った。結果は、後述する。

7-1. 過剰肋骨発現頻度

CT撮影から得られた3D画像から、過剰肋骨の有無及び分類（3分類：痕跡、短小、完全）を観察した。その結果、雌雄ともに用量依存的（5FC-H群>5FC-L群）に過剰肋骨が観察された。その分類は痕跡型が一番多く、対照群では痕跡型のみが観察された（図表27, 28）。なお、過剰肋骨発現に左右差および性差はなかった。

痕跡型は多様な型を示し、成長とともに一部の痕跡型は椎骨と癒合したが、その癒合率には対照群と差はなかった（図表29）。

7-2. 個体の発達に伴う肋骨伸長度

各個体の第13肋骨および過剰肋骨の伸長が、個体の成長に従って差がないかをTwo way repeated ANOVA (二次元配置反復測定分散分析)による解析にて確認した(個体別に解析)。同様に、第13肋骨長に対する過剰肋骨の割合についても解析した。即ち、各個体（因子1）とCT撮影時期（因子2）の2要因にてtwo-way repeated ANOVAを行った。Type b（短小）およびType c（完全）は対照群には認められなかったために5FC-H群および5FC-L群間の2群間にて解析を実施した。

結果を下記に記す。

因子 1 (F1): 動物番号

因子 2 (F2): 生後CT撮影日 (P)

(1) 雄出生児

	Type a (痕跡)			Type b (短小)			Type c (完全)		
	13R	14R	ratio	13R	14R	ratio	13R	14R	ratio
F1	n	n	n	n	n	n	n	n	n
F2	y	y	y	y	y	n P=0.052	y	y	y
F1 x F2	y p<0.001	n	n	n	n	y p=0.024	n	n	n
Post hoc	a)			b)					

n: 有意差なし, y: 有意差あり

a), P26とP35に5FC-H群と対照群間に有意差あり。P53とP60に5FC-H群と対照群間に、5FC-H群と5FC-L群間に有意差あり。⇒痕跡型を有する児の5FC-H群の第13肋骨長が長いことを示す。

b), P14とP26に5FC-5FC-H群と5FC-L群間に有意差あり。⇒5FC-H群にて過剰肋骨の伸長度が高いという結果であるが、因子2に有意差がなかったことに起因した変化と考えられる。

(2) 雌出生児

	Type a (痕跡)			Type b (短小)			Type c (完全)		
	13R	14R	ratio	13R	14R	ratio	13R	14R	ratio
F1	y	n	n	n	n	n	n	n	n
F2	y	y	y	y	y	n	y	y	n
F1 x F2	y p<0.001	n	n	n	n	n	n	n	n
Post hoc	a)								

n: 有意差なし, y: 有意差あり

a), P26に5FC-H群と対照群間、5FC-L群と対照群間、5FC-H群と5FC-L群間に有意差あり。P43に5FC-H群と対照群間、5FC-L群と対照群間に有意差あり。P61に5FC-H群と対照群間、5FC-L群と対照群間、5FC-H群と5FC-L群間に有意差あり。⇒痕跡型を有する児の5FC-H群の第13肋骨長が長いことを示す。

個体ごとに発生過程の過剰肋骨発達の軌跡を解析した結果、雌雄ともに、過剰肋骨の型に関係なく、第13肋骨長に対する過剰肋骨長の割合が個体の発達過程においても差がなかったことが明らかになった。

また、5-FC投与により痕跡型を有する児では第13肋骨の伸長度が顕著である傾向がみられたが、対照群の発現数が少ないことにも起因している結果と考えられた。

7-3. 第13肋骨(正常最終肋骨)の各CT撮影日における群間差(雄)

a. 第13肋骨長の左右差

過剰肋骨を有さない第13肋骨(最終肋骨)の長さを測定し、左右差を確認した。5FC-H群の生後4日および26日の左側の13肋骨長が右側と比較して短かった。しかし、生後26日は対照群も同様の結果がみられたことや、その差は僅かであったことから、CT撮影時に撮

影台に乗せた生体が多少左右どちらかに傾いていたことによるMIP画像の偏りが生じたと考えられた（図表30）。

b. 過剰肋骨の存在による第13肋骨長への影響

過剰肋骨を有さない個体の第13肋骨長といずれかの型の過剰肋骨を有する個体の第13肋骨長を比較した。左右別および左右合計にて第13肋骨長を比較した結果、対照群、5FC-Lおよび5FC-H群のいずれにおいても過剰肋骨を有する個体の第13肋骨長は過剰肋骨を有さない個体と比較して長かった（図表31, 32, 33）。

c. 痕跡型の過剰肋骨存在下による第13肋骨長への影響

各撮影日における痕跡型の過剰肋骨の存在による第13肋骨長への影響を群間にて比較した。その結果、対照群と比較して5-FC投与群では第13肋骨長が長い傾向がみられ、5FC-H群では顕著であった（図表34）。

痕跡型の過剰肋骨の長さ、および第13肋骨長に対する痕跡型過剰肋骨長の比は、生後4から生後60日のいずれの時期においても3群間にて差はなかった（図表35, 36）。

d. 短小型の過剰肋骨存在下による第13肋骨長への影響

各撮影日における短小型の過剰肋骨の存在による第13肋骨長への影響を5FC-Hおよび5FC-L群間にて比較した。観察数が少なかったが、各撮影日における短小型の過剰肋骨の存在による第13肋骨長、短小型の過剰肋骨の長さ、および第13肋骨長に対する短小型過剰肋骨長の比は、生後4から生後60日のいずれの時期においても両群間に差はなかった（図表37, 38, 39）。

e. 完全型の過剰肋骨存在下による第13肋骨長への影響

各撮影日における完全型の過剰肋骨の存在による第13肋骨長への影響を5FC-Hおよび5FC-L群間にて比較した。観察数が少なかったが、各撮影日における完全型の過剰肋骨の存在による第13肋骨長、完全型の過剰肋骨の長さ、および第13肋骨長に対する完全型過剰肋骨長の比は、生後4から生後60日のいずれの時期においても両群間に差はなかった（図表40, 41, 42）。

7-4. 第13肋骨(正常最終肋骨)の各CT撮影日における群間差(雌)

a. 第13肋骨長の左右差

過剰肋骨を有さない第13肋骨（最終肋骨）の長さを測定し、左右差の有無を確認した。各撮影日における第13肋骨長には3群間で差はなかった（図表43）。

b. 過剰肋骨の存在による第13肋骨長への影響

過剰肋骨を有さない個体の第13肋骨長といずれかの型の過剰肋骨を有する個体の第13肋骨長を比較した。左右別および左右合計にて第13肋骨長を比較した結果、対照群、5FC-Lおよび5FC-H群のいずれにおいても過剰肋骨を有する個体の第13肋骨長は過剰肋骨を有さない個体と比較して長かった。その程度は5FC-H群で顕著であった（図表44, 45, 46）。

c. 痕跡型の過剰肋骨存在下による第13肋骨長への影響

各撮影日における痕跡型の過剰肋骨の存在による第13肋骨長への影響を群間にて比較した。その結果、対照群と比較して5-FC投与群では第13肋骨長が長い傾向がみられ、5FC-H群では顕著であった（図表47）。

痕跡型の過剰肋骨の長さは生後26日および生後43日において5-FC投与群に有意差がみら

れ、第13肋骨長に対する痕跡型過剰肋骨長の比においても同時期に有意差がみられた（図表48, 49）。これらの結果は、対照群の発現数が少ないことも考慮する必要がある。また、性成熟完成日に差はないことや、2-way repeated ANOVA解析の結果から、毒性学的にはあまり意味のない変化と考えられる。

d. 短小型の過剰肋骨存在下による第13肋骨長への影響

各撮影日における短小型の過剰肋骨の存在による第13肋骨長への影響を5FC-Hおよび5FC-L群間にて比較した。その結果、各撮影日における短小型の過剰肋骨の存在による第13肋骨長、短小型の過剰肋骨の長さ、および第13肋骨長に対する短小型過剰肋骨長の比は、生後4から生後61日のいずれの時期においても両群間に差はなかった（図表50, 51, 52）。

e. 完全型の過剰肋骨存在下による第13肋骨長への影響

各撮影日における完全型の過剰肋骨の存在による第13肋骨長への影響を5FC-Hおよび5FC-L群間にて比較した。その結果、各撮影日における完全型の過剰肋骨の存在による第13肋骨長、短小型の過剰肋骨の長さ、および第13肋骨長に対する短小型過剰肋骨長の比は、生後4から生後61日のいずれの時期においても両群間に差はなかった（図表53, 54, 55）。

8) 考察

ラット妊娠9日に5-FCを単回経口投与し自然分娩させ、過剰肋骨を誘発した出生児を得た。生後約9週間、動物用CT撮影装置を用いて、同一個体における過剰肋骨の生後観察を行った。

本試験条件下では、分娩状態、出生率、児の生存率に5-FC投与による影響はなく、一般毒性的観察項目にも影響はなかった。過剰肋骨の発現頻度に性差および左右差はなかった。CT撮影観察の結果、出生児の発達とともに過剰肋骨も大きくなった。しかし、生後4日に3つに分けた分類から、出生児の発達に従って分類が変化する（痕跡型が短小型あるいは完全型に形態を変える）過剰肋骨はなかった。二元配置反復測定分散分析（個体×撮影日）の結果からも、生体の成長を逸脱する伸長はなく、また、性成熟の影響も認められなかった。また、正常最終肋骨となる第13肋骨に対する第14肋骨（過剰肋骨）の割合は、生後4日から生後60日まで、ほぼ一定であった。過剰肋骨を有する個体では、体重には差はなかったが、第13肋骨の長さが過剰肋骨を有さない個体よりも長い傾向が観察された。今回、第13肋骨のみ長さを測定したが、第14肋骨（過剰肋骨）が発現したことにより、第1から第13肋骨まですべて肋骨が長い可能性も否定できない。

生後、過剰肋骨は椎骨と癒合し消失するといわれてきた。通常の生殖毒性試験において、出生児の骨格観察は軟X線により撮影された写真を用いて評価をする。今回、骨格観察により過剰肋骨を確認した生後21日の出生児を軟X線にて撮影すると、完全型および短小型の過剰肋骨は確認できたが、痕跡型の過剰肋骨は検出できなかった（図表58）。一方、本実験ではCT撮影により、痕跡型の過剰肋骨は検出できている。1994-2010年の背景データ（Ema et al., 2015）と、今回収集した2011-2015年の背景データとの間で過剰肋骨の発現頻度に大きな差はないことも併せて考えると、生後に過剰肋骨は消失すると考えられてきた理由として、軟X線ではX線の強さが弱く痕跡型の過剰肋骨が確認できてい

なかったと考えられた。今回の CT 撮影から、痕跡型の過剰肋骨は、生後、成長とともに部分的あるいは全体が椎骨と癒合することも確認できたが（図表 29B）、全ての痕跡型が椎骨と癒合するわけではなく（癒合率 22-57%）、また薬剤誘発性と対照群との癒合頻度に顕著な差はないことを確認している。

CT 撮影による解析からは、過剰肋骨を有する椎骨と有さない椎骨に明らかな形態的な差はなく、第一腰椎が胸椎化したのか、第一腰椎に過剰肋骨が発現したのかは、識別が困難であった。また、椎骨には多くの突起が存在するが（図表 59, 60, 61）、その骨化および形態には個体内でも左右差があった（図表 59 黄色円領域）。今回、同一個体を撮影していく過程にて、椎骨横突起の腹結節領域に、生後 26 日以降、過剰肋骨様に撮影される個体が存在した。しかし、胎児末期に軟骨様の過剰肋骨であっても生後 4 日観察時には軟骨のみの過剰肋骨は観察されなかったことから、生後に過剰肋骨が発現するとは考えにくい。対照群にも認められたことや、このような骨片は生後 60 日にて椎骨と完全に癒合して観察されたことから、生後に過剰肋骨が発現するのではなく、横突起腹結節の骨化度の違いによる変化と考えられる。ラットを用いた本実験から、CT 画像は同一個体を経時的に観察できることが利点ではあるが、欠点として幼若な軟骨が透過してしまうことや、機器上、撮影可能な体積が限られており、成長が進むにつれて撮影領域が限られてしまうことがあげられる。

以上の結果から、過剰肋骨は、生後、生体の発達に伴った成長はするが、性成熟の影響もなく過剰に伸長することはないと考えられた。

（3）研究全体の成果、考察及び結論

背景データ：

国内で実施されたラット生殖発生毒性試験（催奇形性試験）の背景データを収集した。各施設間のみならず、ガイドライン（医薬、農薬、化学物質など）によっても、胎児所見の異常と変異の分類が異なることが明らかになった。従って、リスク評価の際には、単に異常と変異といった分類から評価するのではなく、その所見の自然発生性の発現頻度を加味して評価をすることが重要であると考えられた。

現在、日本先天異常学会の用語委員会が中心となって、用語の統一や分類の再評価を開始したところである。所見名の統一は写真掲載をあわせた解説付与により、類似用語の統一が期待される。しかし、分類の統一には、管轄行政の違いや各施設の慣習もあることから、解決すべく課題が多く時間を要すると考えられる。

また、三極（ドイツリスク評価機関であるBfR、米国EPA、日本）による異常と変異の分類についての統一見解をまとめていくことも開始されている。多数決的な取り決めではなく、分類の根拠（背景）を明らかにする方向性を期待する。また、科学的根拠（発現機序解明）を基に、異常と変異の定義の必要性も併せて、議論をされていくべきであると考えられた。

過剰肋骨発現機序：

本課題では、陽性対象物質として 5-FC を用いた。既報と同様に過剰肋骨は認められた。胎生末期胎児での骨格標本観察と分娩後の出生児を用いた CT 画像での観察を比較

した結果、過剰肋骨の発現頻度は対照群および 5-FC 投与群ともにほぼ同等であった。分類別では、出生児観察では痕跡型が一番多く、続いて短小型 \geq 完全型であった。

2 か所のブリーダーから入荷した SD 系ラットを比較した結果、胎児期観察では、Slc:SD ラットでは痕跡型 \geq 完全型 $>$ 短小型であったが、CrI(CD):SD ラットでは 3 型ほぼ同程度の発現頻度であった（ブリーダー間差が存在した。）。両 SD ラットともに、妊娠 20 日の胎児骨格標本観察では、第一腰椎部に軟骨片が観察される胎児が存在した。生後 4 日の骨格標本観察時には、軟骨のみの過剰肋骨を示す出生児は存在しなかったため、胎児で観察された軟骨片は生後 4 日までに骨化した過剰肋骨になると考えられた。胎児期での観察において、骨片が小さいために、痕跡型と短小型との分類が困難である場合もある。このような原因により、胎児観察と出生児観察との間で過剰肋骨の発現頻度および分類の内訳に差が生じたと考えられた。したがって、5-FC 実験において、過剰肋骨が出産前後にて大きく形態を変化させることはないと考えられた（胎児期評価にて過剰肋骨の評価は可能であることを示唆する。）。

今回、骨格染色には軟骨も染色する二重染色を実施した。しかし、背景データ収集参加 24 施設中、二重染色を通常実施している施設は 2 施設のみ（農薬 GLP 実施施設）であり、大多数の施設が骨化した骨だけで評価をする単染色を実施して評価していた。染色法の違いによっても過剰肋骨の発現頻度は異なる要因となる。

また、便宜的に本課題では過剰肋骨の程度を 3 分類に分けたが、生後に過剰肋骨が伸長することがないこと、染色法により胎児期に検出できる過剰肋骨が異なること、境界領域は主観による判断になることから、分類をしなくても発現頻度のみでも十分に評価はできると考えられた（分類するのであれば、二分類；短小あるいは完全）。肋骨の伸長の発現機序が解明されることで、分類の意義も明確になると期待される。

本課題では、複数回にわたり動物実験を行い、胎児および出生児の骨格観察を行った。5-FC 誘発性の過剰肋骨の発現頻度は、動物実験ごとに大きな相違はなかったが、過剰肋骨の 3 分類の発現順には一貫性がなかった。一方、対照群では、全ての腹に認められるわけではなく、一腹あたりの発現頻度には、ばらつきがあった（雄：0-60%：平均 8.5%）、雌 0-50%：平均 7.4%）。過剰肋骨発現臨界期の時期の胚の発達は、多産系であるラットでは腹間および腹内でも発生度が異なる。この発生の違いがラットにおける過剰肋骨発現の再現性に影響を及ぼすと考えられる。

収集した背景データの結果から、SD 系ラット(CrI(CD)SD)では 0.06-15.1%、Wistar Hannover ラットでは 0.9 - 49.93%で過剰肋骨がみられ顕著な系統差が認められた。さらに、これらの数字のばらつきは、両系統ともに試験によっては、対照群に過剰肋骨が 1 例も認められない場合と、比較的多くの児に過剰肋骨が観察される試験があることを示している。また、同じ SD 系ラットでもブリーダーにより過剰肋骨の発現頻度に相違があった。

過剰肋骨の発現臨界期はラットでは妊娠 9 日である。また、母動物のストレスや低血糖、妊娠期のハーブ投与、バルプロ酸やサルチル酸ナトリウム(SAL)投与などにより過剰肋骨が発現することが知られている(Beyer and Chernoff, 1986; Kuwata C et al., 2017; Chernoff et al., 1991, 2004. Kimmel et al., 1974, Foulon et al., 1999; Ko et al., 2010)。我々は、5-FC 実験と同じ実験プロトコールにて 5-FC と SAL の過剰肋骨発現を比較した結果、5-

FC と比較して SAL は比較的長い発現臨界期であることを明らかにした(Kuwagata et al,2019 in press)。この結果は、通常の催奇形性試験において、過剰肋骨のみを指標にすると、5-FC のように発現臨界期が短い化合物の場合には過剰肋骨を検出できていない可能性を示している。

本課題にて 5-FC 誘発による過剰肋骨の発現機序として、胸椎・腰椎境界決定因子となる *Hoxa10* 発現位置の尾方化によることを明らかにした。また、5-FC 誘発による指の異常は、投与時期（妊娠 13 日）に対応した *Hox11-13* の発現抑制に起因していることを明らかにした。即ち、HOX に影響を及ぼす化合物は、器官形成期の連続投与となる生殖発生毒性試験では、投与時期に対応した *Hox* 遺伝子が影響を受け、その結果として、それぞれの *Hox* 遺伝子に対応した奇形が併発することが考えられた。これらのことから、薬剤誘発性の過剰肋骨は複数の奇形を併発し、自然発生性の過剰肋骨は単独発現ではないかと考えた。しかし、自然発生性に過剰肋骨を有した胎児が他にどのような奇形を誘発していたかの追加背景データ収集の結果、自然発生性の過剰肋骨においても単独で発現している胎児よりも他の形態変化（骨化不全および椎骨数増加）と併発していることが明らかになった。得られた結果から、自然発生性においても HOX 発現異常を示唆する椎骨数増加が含まれていた。薬物誘発性の過剰肋骨の場合には、併発している形態異常の種類（指の異常など）に留意することが重要である。

疫学調査から、日本人には過剰肋骨発現率が(5.8%、13/211)と比較的高い(A. Nakajima et al., 2014)。過剰肋骨の長さによって日常生活に影響を及ぼすかどうかは、臨床判断にゆだねられる。

結論

自然発生性の過剰肋骨発現率では比較的高く、ラットには系統差があること、また同系統（SD 系）においてもブリーダーによってあるいは入荷ロットによって発現頻度が異なることが明らかになった。また、自然発生性の過剰肋骨においても HOX 発現異常を示唆する形態変化を併発していた。

5-FC 誘発性の過剰肋骨は *Hoxa10* 遺伝子発現の尾方化により発現していると考えられた。薬剤誘発性の過剰肋骨は化合物によって発現臨界期が異なることが我々の検討から明らかになった。即ち、5-FC のように臨界期が狭い化合物は、GLP 施設で実施する生殖発生毒性試験では検出できない場合もあることを示している。また、同一動物での生後の過剰肋骨観察から、生後に逸脱した伸長はしないことが明らかになり、胎児観察時での評価と相違はないことが明らかになった。

げっ歯類における過剰肋骨の毒性学的意義を論じるには、薬物誘発ではどのようにして *Hox* が変化するのか、自然発症では *Hox* 関連のどこに遺伝子異常があるのかを研究する必要がある。しかしながら、自然発生性に発現頻度が高く、また、発現頻度にばらつきがあることから、感度のよいランドマークではない。動物試験において、過剰肋骨が観察された際には、他のランドマークと合わせて総合的に評価をするべき骨格変異である。

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。)

1-1. M. Kuwagata, Y. Sakai, S. Tanaka et al., Historical control data on developmental toxicity studies in rats. ◎Congenital Anomalies, *Accepted on Aug 7. 2018.*

doi: 10.1111/cga.12305.

1-2. M. Kuwagata, M. Senuma, M. Todoroki, F. Kumagai, T. Kumamoto, T. Ogawa. Induction of a thoracolumbar supernumerary rib in rat developmental toxicity studies: A short discussion on the critical window. ◎ Congenital Anomalies, *Accepted on Nov 29. 2018.* doi: 10.1111/cga.12320.

1-3. T. Kumamoto, M. Senuma, M. Todoroki, F. Kumagai, H. Imai, R. Suzuki, T. Ogawa, M. Kuwagata., 5-Fluorocytosine induces fetal skeletal malformations in rats by altering expression of Homeobox genes. ◎Reproductive Toxicology. *Revised ongoing* (returned revised decision on Apr.16. 2019)

2 本研究を基にした学会発表の実績

1) 国内過去5年間に実施されたラット発生毒性試験背景データ収集プロジェクト経過報告 桑形麻樹子

食品薬品安全センター秦野研究所 研究開発部

第57回日本先天異常学会学術集会・第6回日本DOHaD学会学術集会 ワークショップ：
生殖発生毒性試験の国際標準化 WS-2

2017年8月26日～28日 (東京、早稲田大学)

2) 2011-2015年に国内で実施されたラット発生毒性試験背景データ収集プロジェクト 1. 概要 桑形麻樹子1)、江馬 眞2)、西沢紫乃3)、藤原道夫4)、堀本政夫5)、峯島 浩6)

1)食品薬品安全センター秦野研究所 研究開発部、2) (国研) 産業技術総合研究所 安全科学研究部門、3) 帝人ファーマ (株) 生物医学総合研究所 薬理研究部、4) アステラス製薬 (株) 安全性研究所、5) 千葉科学大学 危機管理学部、6) エーザイ (株) 筑波安全性研究部

第57回日本先天異常学会学術集会・第6回日本DOHaD学会学術集会 一般演題 P-50

2017年8月26日～28日 (東京、早稲田大学)

3) ラット発生毒性試験の背景データ 2011-2015年のCrI:CD(SD)系統の背景データ

立石大志、衣斐彼方、上杉 透、宇部雅進、大田泰史、梶田晋平、片桐龍一、桐畑佑香、工藤 哲、坂井祐子、左海友美、清水達也、瀬沼美華、高島宏昌、田中 翔、谷口輝政、中野奈央、則武健一、平野隆之、北條 仁、松岡俊樹、三輪洋司、矢部 薫、山下晃人、江馬 眞、西沢紫乃、藤原道夫、堀本政夫、峯島 浩、桑形麻樹子 (収集事業参加24機関代表者とコアメンバー)

第57回日本先天異常学会学術集会・第6回日本DOHaD学会学術集会 一般演題 P-51

2017年8月26日～28日 (東京、早稲田大学)

4) ラット発生毒性試験の背景データ：2011-2015年のWistar Hannover系ラットの背景データ

谷口輝政、衣斐彼方、上杉 透、宇部雅進、大田泰史、梶田晋平、片桐龍一、桐畑佑香、工藤 哲、坂井祐子、左海友美、清水達也、瀬沼美華、高島宏昌、立石大志、田中 翔、中野奈央、則武健一、平野隆之、北條 仁、松岡俊樹、三輪洋司、矢部 薫、山下晃人、江馬 眞、西沢紫乃、藤原道夫、堀本政夫、峯島 浩、桑形麻樹子（収集事業参加24機関代表者とコアメンバー）

第57回日本先天異常学会学術集会・第6回日本DOHaD学会学術集会 一般演題 P-52
2017年8月26日～28日（東京、早稲田大学）

5) フルシトシン誘発性過剰肋骨の発現機序解明の予備的検討

熊本隆之 1)、今井元 2)、鈴木礼子 2)、小川哲郎 3)、小林健一 4)、堀本政夫 5)、瀬沼美華 6)、桑形麻樹子 7)

1) 奥羽大・薬、2) 奥羽大・歯、3) 埼玉医大・生理、4) 安衛研、5) 千葉科学大・危機管理、6) 食品薬品安全センター・安全性事業部、7) 食品薬品安全センター・研究開発部
第57回日本先天異常学会学術集会・第6回日本DOHaD学会学術集会、一般演題 P-57
2017年8月26日～28日（東京、早稲田大学）

6) ホメオボックス因子に注目したフルシトシン誘発性過剰肋骨の発現機序解明

熊本隆之 1)、鈴木愛美 1)、今井元 2)、鈴木礼子 2)、小川哲郎 3)、熊谷文明 4)、等々力舞 4)、瀬沼美華 4)、桑形麻樹子 4)

1) 奥羽大・薬、2) 奥羽大・歯、3) 埼玉医大・生理、4) 食品薬品安全センター・安全性事業部
第45回 日本毒性学学術年会(大阪国際会議場) 一般演題
2018年7月18～20日

7) フルシトシン誘発性過剰肋骨の発現機序に関する検討

熊本隆之 1)、鈴木愛美 1)、今井元 2)、鈴木礼子 2)、小川哲郎 3)、熊谷文明 4)、等々力舞 4)、瀬沼美華 4)、桑形麻樹子 4)

1) 奥羽大・薬、2) 奥羽大・歯、3) 埼玉医大・生理、4) 食品薬品安全センター・安全性事業部
第58回日本先天異常学会学術集会 一般演題
2018年7月27日～29日(東京、ベルサール新宿)

8) フルシトシンのラット妊娠9日および13日投与による胎児骨格発生への影響

瀬沼美華 1)、等々力舞 1)、熊谷文明 1)、熊本隆之 2)、小川哲郎 3)、桑形麻樹子 1)

1) 一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 安全性事業部、2) 奥羽大学 薬学部、3) 埼玉医科大学 医学部
第58回日本先天異常学会学術集会 一般演題
2018年7月27日～7月29日（東京都新宿区）

9) ラット胎生期フルシトシン投与による過剰肋骨の生後変化

桑形麻樹子、熊谷文明、瀬沼美華、等々力舞
 食品薬品安全センター秦野研究所・安全性事業部
 第58回日本先天異常学会学術集会 一般演題
 2018年7月27日～7月29日（東京都新宿区）

10) Research on the mechanism of thoracolumbar supernumerary rib development after birth using CT scanning

Makiko Kuwagata
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center,
 9th Berlin-Workshop on developmental toxicology as satellite event to the 46th Annual meeting of the European teratology society
 13. Sep. 2018- 14. Sep. 2018 (Berlin, Germany) *Invited lecture.*

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）

該当なし

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
<p>(1) <u>発生毒性試験における胎児観察背景データ収集</u></p> <ul style="list-style-type: none"> 各企業、受託機関に依頼をし、2011年から2015年に実施された発生毒性試験の背景データ(帝王切開所見および胎児観察データ)を収集、データ化する。 胎児観察における形態異常あるいは変異所見の分類の再検討、用語の統合性の必要性といった課題を明らかにする（日本先天異常学会胎児観察用語委員会との協力）。 リスク評価時に重要視す 	5	<ul style="list-style-type: none"> 国内 24 の研究機関からデータが提供されたことにより、背景データが収集でき、学会・論文発表にまでつなげた。 胎児観察の異常および変異の分類法、用語、染色法の相違が明確になり、今後の問題点共有につながった。本事業の成果発表を関連学会で発表したことにより、日本先天異常学会用語委員会と連携し、問題を共有していくことになった。 欧州先天異常学会の分科会にあたる Berlin Workshop にて、日本先天異常学会用語委員会が日本の分類基準を発表した。この WS に招待され過剰肋骨の生後観察の経過報告したことにより、三極との話し合いに同席でき用語問題の共有ができた。また、これを機に、ドイツリスク評価機関である BfR と 2019 年 7 月に話し合いを持つことにつながった。その会議に出席する予定で

<p>べき形態変化を選別する。</p>		<p>ある。</p>
<p>(2) <u>抗真菌剤フルシトシン(5-FC)投与による過剰肋骨の発現機序解明:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 5-FC 誘発過剰肋骨の発現機序について中軸骨格決定遺伝子群および細胞死パターンから明らかにする。 ・ 同腹内での胎児発達段階の違いによる 5-FC への影響の有無を明らかにする。 	<p>4</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ 5-FC 誘発性の過剰肋骨の発現機序のひとつは解明できた (<i>Hoxa10</i> 発現の尾方化)。また、5-FC は細胞周期を一時的に止めるだけで、アポトーシスは誘導していないと考えられた。今回の結果は投与後 4 日目の解析である。今後、投与直後に <i>Hox</i> 遺伝子発現に影響を与える分子を検討する課題が残された。 ・ 過剰肋骨の発現臨界期であるラット妊娠 9 日に胎児発達段階を考慮して投与時間を 3 段階 (早朝、昼、夕方) に分けて検討した結果、5-FC の感受期は早朝にあり、過剰肋骨発現臨界期は非常に狭いことが明らかになった。通常の GLP 試験では投与しない時間である。また、サルチル酸ナトリウムでも同様に検討した結果、5-FC と比較して感受期が比較的長いことを明らかにした。これは、化合物によっては GLP 試験であっても過剰肋骨臨界期に投与しておらず、過剰肋骨を検出できないことを示唆している (良いランドマークではない)。
<p>(3) <u>総合評価</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ リスク評価時に有用な発生毒性試験の背景データを公表する。 ・ 過剰肋骨をはじめとし、評価法の改良の必要性を形態所見ごとに提案する。 ・ げっ歯類発生毒性試験の投与開始時期における同腹内胎児の発育段階の違いと化学物質投与により発現する過剰肋骨との関連性を明らかにする。 ・ リスク評価における過剰肋骨の意義について考察 	<p>4</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ 背景データ収集結果は論文発表した。 ・ 日本先天異常学会にて結果を公表し、用語委員会と情報を共有した。 ・ 5-FC 誘発性過剰肋骨の発現機序の一因として <i>Hoxa10</i> 発現の尾方化があげられた。 ・ 過剰肋骨はリスク評価において感度のよいランドマークではないと考えられた。

する。		
-----	--	--

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>GLP 施設でしかできない大規模な動物実験を2年半かけて複数回実施し、ラットにおける過剰肋骨の毒性学的意義の一考察につながった。最新機器のCT装置を導入した生後の過剰肋骨の推移を確認できたことにより、これまでの胎児評価とあわせて考察ができ達成度が高い。</p> <p>機序解明については、大学所属の研究者との共同研究により、正確な実験が遂行でき、次へのステップにつながった。</p> <p>また、24施設の国内研究機関の多大なる協力のもと、背景データ収集および過剰肋骨の毒性学的意義を考えるにつながる基礎データが得られた。</p>
(2) 研究成果の有用性	5	<p>背景データ集は、国内で生殖試験を実施しているほとんどの研究機関から得られたデータであることから、有用性は非常に高いと考えられる。</p>
<p>総合コメント</p> <p>本課題は国内24機関の協力がなければ、研究の遂行および結果の考察が難しかった。特に、平成30年度の追加データ収集から、自然発生性の過剰肋骨も5-FCと同様にHOX遺伝子発現異常を示唆する形態変化が観察されることが明らかになったことは、リスク評価時に非常に参考となる知見である。また、動物用CT撮影装置の導入により、同一個体の過剰肋骨の生後観察が可能となり、生後に過剰肋骨の形態分類が変化しないことを明らかにした。この結果は、胎児観察において評価可能であることを証明している。</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。

※次のただし書を枠で囲って記載すること。

<p>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。</p>
--