

平成 24 年度 第 1 回ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会
議事次第

日時：平成 25 年 1 月 15 日（火） 11:30-12:00

場所：国立環境研究所特別会議室

議題：

1. 本委員会の検討内容について（資料 2）
2. 研究計画（研究従事者）の変更について（資料 3）
3. ヒト ES 細胞使用研究の進捗状況の報告（資料 4）
4. 教育訓練の実施について（参考資料 2）
5. その他（事務局）

資料 1 委員名簿

資料 2 独立行政法人国立環境研究所ヒト ES 細胞使用研究倫理規定

資料 3 研究従事者変更履歴

資料 4 ヒト ES 細胞使用報告書

参考資料 1 ヒト ES 細胞使用計画書

参考資料 2 - 1、2 - 2 これまでに実施した教育研修の一覧

資料 1

委員名簿

	氏名	職名等	分野	
委員長	住 明正	理事	一般	
内部委員	鎚木 儀郎	理事	一般	
	新田 裕史	環境健康研究センター	医学	
	高村 典子	生物・生態系環境研究センター	生物	
	滝村 朗	企画部	一般	
	川嶋 貴治	生物・生態系環境研究センター	生物	
	中山 祥嗣	環境健康研究センター	医学	
	久保田 泉	社会環境システム研究センター	法学	
	川村 和江	総務部	一般	
	外部委員	土屋 尚之	筑波大学人間総合科学研究科教授	医学・倫理
		稲葉 裕	実践女子大学生生活科学部教授	医学・倫理
中川 明		弁護士	法学	
小笹 由香		東京医科歯科大学生命倫理研究センター	倫理	
菊田 洋子		柏市消費行政推進員	一般	
幹事	青木 康展	環境リスク研究センター		

独立行政法人国立環境研究所ヒトES細胞使用研究倫理規程

平19規程第18号

平成19年10月1日

平成21年11月5日一部改正

平成22年7月26日一部改正

(目的)

第1条 この規程は、独立行政法人国立環境研究所（以下「研究所」という。）が実施するヒトES細胞を使用する研究（以下「研究」という。）に関し、「ヒトES細胞の使用に関する指針」（平成21年文部科学省告示第百五十七号。以下「指針」という。）を遵守する上で必要な事項を定めることにより、人間の尊厳が尊重され、研究が適正に実施されることを確保することを目的とする。

(用語の意義)

第2条 この規程において使用する用語の意義は、特に定めるもののほか、指針において使用する用語の例による。

(基本方針)

第3条 研究所における研究は、基礎的研究に限るものとし、ヒトES細胞の樹立又はヒトES細胞及びこれに由来する細胞の人体への適用に関する研究は行わない。

2 研究の実施に当たっては、指針に規定する使用の要件のほか、次の事項を条件とする。

- (1) 人間の尊厳を尊重すること。
- (2) 科学的妥当性及び倫理的妥当性の観点から研究の適正な実施が確保されること。
- (3) 第9条に規定するヒトES細胞研究倫理審査委員会による事前の審査により研究の適合性が確保されること。
- (4) 研究結果の公表を通じ研究の透明性を確保すること。

(他の法令等との関係)

第4条 研究の実施に当たっては、この規程に定めるほか、法令、指針及び研究所の諸規程等の定めるところによる。

(理事長の責務)

第5条 理事長は、使用機関の長として、研究所におけるヒトES細胞の管理及び研究の適正な実施に関する業務を総括するとともに、次の業務を行う。

- (1) 研究の実施に関し、科学的妥当性及び倫理的妥当性について検討し、使用計画及びその変更を承認するか否かを決定すること。
- (2) 研究の進行状況及び結果を把握するとともに、必要に応じて使用責任者に対する指導を行い、研究を監督すること。
- (3) 研究所において指針を周知し、これを遵守させること。

(使用責任者の責務)

第6条 使用責任者は、使用計画ごとに1名とし、ヒトES細胞の使用に関して十分な専門的知識及び技術を有し、研究を適正に実施できる者とする。

2 使用責任者は、使用計画の立案及び研究の実施に当たっては、第3条の基本方針を遵守するとともに、次の業務を行う。

- (1) 研究の実施に関し、指針に定める使用の要件等を踏まえ、科学的妥当性及び倫理的妥当性について検討すること。
- (2) 前号の検討結果に基づき使用計画を作成すること。
- (3) 研究の実施に関し、適正に実施されていることの確認及びヒトES細胞を取扱う研究者（以下「研究者」という。）を指導すること。
- (4) 研究の進行状況及び結果に関し、随時、理事長及び第9条に規定する倫理審査委員会に報告すること。
- (5) その他研究の総括に当たり必要な事項を検討すること。

3 使用責任者は、使用計画について、理事長の承認を受けなければならない。

4 使用責任者は、理事長が承認した使用計画に従い、ヒトES細胞の入手、使用、保管、廃棄等に関して適切な管理を行うことにより、研究の適正な実施を確保しなければならない。

5 使用責任者は、当該使用計画における研究者がヒトES細胞を適切に取扱うよう、研究を実施する前に、第17条第1項に規定する教育を受け、国の策定する法令、指針等及びこの規程を熟知した上で、研究者を指導及び監督しなければならない。

6 使用責任者は、ヒトES細胞の不適切な取扱いがあった場合は、速やかに理事長及び第9条に規定する倫理審査委員会に報告しなければならない。

(研究者の責務)

第7条 研究者は、使用計画ごとに、あらかじめ使用責任者が指名する。

2 研究者は、研究を実施する前に、第17条第1項及び第2項に定める教育を

受け、国の策定する法令、指針等及びこの規程を熟知するよう努めなければならない。

- 3 研究者は、使用責任者の指導及び監督のもと、理事長が承認した使用計画に従い、ヒトES細胞の使用、保管、廃棄等に関して適切に実施することにより、研究を適正に実施しなければならない。

(禁止行為)

第8条 研究所において研究に携わる者は、次に掲げる行為を行ってはならない。

- (1) ヒトES細胞を使用して作成した胚の人又は動物胎内への移植並びにその他の方法によりヒトES細胞からの個体生成を行うこと。
- (2) ヒト胚又はヒト胎児へヒトES細胞を導入すること。
- (3) ヒトES細胞から生殖細胞を作成すること。

(ヒトES細胞研究倫理審査委員会)

第9条 研究所に、独立行政法人国立環境研究所ヒトES細胞研究倫理審査委員会（以下「委員会」という。）を置く。

- 2 委員会は、理事長の諮問に応じ、使用計画に関して、研究倫理の観点及び科学的妥当性の観点から審査し、理事長に対し文書により意見を述べるものとする。
- 3 委員会は、審査の過程を記録し、保管するものとする。
- 4 委員会は、審査を行った使用計画に関して、その実施状況等について調査し、その結果について理事長に対し文書により意見を述べることができる。
- 5 委員会は、理事長の諮問に応じ、研究の倫理に関する基本的事項について検討し、理事長に対し文書により意見を述べるものとする。
- 6 委員会の構成その他必要な事項は、別に定める。

(使用計画の承認手続き)

第10条 使用責任者は、第6条第3項の承認を受けようとするときは、あらかじめ、ヒトES細胞使用計画承認申請書（様式1a）に、指針に規定する事項を記載した使用計画届出書（様式1b）及び使用計画書（様式1c）並びに委員会等における審査に必要な資料を添えて、理事長に申請を行うものとする。

- 2 理事長は、使用計画の申請があったときは、委員会に諮問し、意見を求めるとともに、使用計画の指針に対する適合性を確認するものとする。
- 3 理事長は、使用計画を承認するに当たっては、あらかじめ、委員会における審査の過程及び結果を示す書類（様式2）並びに指針に定められた書類を添えて文部科学大臣に届け出るものとする。

- 4 理事長は、文部科学大臣より受理の通知を受けた後、速やかに使用責任者に使用計画を承認する旨を、ヒトES細胞使用計画承認書（様式5）により通知する。

（使用計画の変更手続き）

第11条 使用責任者は、使用計画等を変更する場合には、あらかじめ、ヒトES細胞使用計画変更申請書（様式3a）に、指針に規定する事項を記載した使用計画変更届出書（様式3b）及び使用計画変更書（様式3c）並びに委員会等における審査に必要な資料を添えて、理事長に申請を行うものとする。

- 2 理事長は、様式1cの項目（1）から（3）、及び（5）から（10）に掲げる事項について使用計画の変更の申請があったときは、委員会に諮問し、意見を求めるとともに、使用計画の変更の指針に対する適合性を確認するものとする。
- 3 理事長は、前項の使用計画の変更を承認したときは、速やかに委員会における審査の過程及び結果を示す書類（様式2）並びに指針に定められた書類を添えて文部科学大臣に届け出るものとする。
- 4 理事長は、様式1cの項目（4）、及び（11）に掲げる事項について使用計画の変更を承認したときは、速やかに指針に定められた書類を添えて委員会に報告するとともに、文部科学大臣に届け出るものとする。
- 5 理事長は、当該使用計画の変更を承認したときは、速やかに使用責任者に使用計画の変更を承認する旨を、ヒトES細胞使用計画変更承認書（様式6）により通知する。

（研究の実施）

第12条 使用責任者及び研究者は、理事長が承認した使用計画書に記載された使用実施場所及び方法により、研究を実施し、又はヒトES細胞及び分化細胞を保管しなければならない。

- 2 使用責任者及び研究者は、研究の実施、ヒトES細胞の保管、廃棄等に当たっては、その内容を記録し、保存しなければならない。

（分配等）

第13条 使用責任者及び研究者は、第16条に定める場合を除き、ヒトES細胞を分配又は譲渡してはならない。ただし、研究所において遺伝子の導入その他の方法により加工されたヒトES細胞についてはこの限りでない。

- 2 使用責任者は、前項ただし書きのヒトES細胞を、使用機関、分配機関又は樹立機関に分配又は譲渡しようとする場合には、あらかじめ、譲渡先の名称

及びヒトES細胞に加えられた加工について、理事長及び委員会に報告するとともに、加工されたヒトES細胞が由来する細胞の分配をした樹立機関又は分配機関に通知するものとする。

(分化細胞の取扱い)

第14条 使用責任者及び研究者は、分化細胞が人の生命の萌芽であるヒト胚を滅失させて樹立されたヒトES細胞に由来するものであることに留意し、その使用、保存及び譲渡に当たっては適切な取扱いに努めるものとする。

2 使用責任者は、作成した分化細胞を譲渡する場合には、あらかじめ、理事長及び委員会に報告し、当該分化細胞がヒトES細胞に由来するものであることを譲渡先に通知するものとする。

(進行状況の報告)

第15条 使用責任者は、ヒトES細胞の使用の進行状況を理事長及び委員会に随時報告するものとする。

(使用計画の終了)

第16条 使用責任者は、使用計画を終了した時は、直ちに、残余のヒトES細胞を、当該ヒトES細胞の分配をした樹立機関若しくは分配機関との合意に基づき廃棄し、又はこれらの機関に返還し、若しくは譲渡するとともに、ヒトES細胞使用終了申請書（様式4a）、ヒトES細胞使用終了報告届出届（様式4b）及びヒトES細胞使用終了報告書（様式4c）を理事長に提出しなければならない。

2 理事長は、前項のヒトES細胞使用終了報告届出届及びヒトES細胞使用終了報告書の提出を受けた時には、速やかに、その写しをヒトES細胞の分配をした前項の樹立機関又は分配機関、委員会及び文部科学大臣に提出するものとする。

(教育の実施)

第17条 理事長は、使用責任者及び研究者に対し、研究を実施する前に、この規程のほか、研究における倫理に関する国内外の関連法令、指針及び必要と認める事項について教育及び研修を行わなければならない。教育研修計画については別に定める。

2 使用責任者は、研究者に対し、研究を実施する前に、前項に規定する事項のほか、ヒトES細胞の取扱い及び管理等の技術に関する事項について教育を行わなければならない。

- 3 理事長及び使用責任者は、前項に定めるもののほか、必要があると判断したときは、研究における倫理面に関する教育を実施することができる。

(実地調査等)

第18条 理事長は、必要があると認めるときは、ヒトES細胞の管理状況及び研究実施状況等を把握するため、実地調査を実施することができる。

- 2 理事長は、研究に関する資料の提出、調査の受入れその他文部科学大臣が必要と認める措置に協力しなければならない。
- 3 使用責任者は、第1項及び第2項の調査等に協力するものとする。

(研究成果等の公開)

第19条 研究成果については、原則として公開する。ただし、知的財産権の保護等に支障があるものに限り、理事長の許可を得て、非公開とすることができる。

- 2 研究成果を公表する場合には、研究が指針に適合して行われたことを明示するものとする。

(必要な措置)

第20条 この規程等に違反し、又はそのおそれのある研究が計画又は実施されていることを知り得た者は、理事長に報告しなければならない。

- 2 理事長は、前項の報告を受けた場合において、必要があると認めるときは、研究の制限又は中止その他必要な措置を請じなければならない。
- 3 理事長及び使用責任者は、第1項の報告をしたことを理由として、その者に対して不利益な取扱いをしてはならない。

(盗難及び紛失時の措置)

第21条 ヒトES細胞及び分化細胞の盗難又は紛失を発見した者は、直ちに理事長及び使用責任者並びに総務部長に連絡しなければならない。

- 2 前項の連絡を受けた理事長及び使用責任者は、直ちに必要な措置を請じなければならない。
- 3 理事長及び使用責任者は、前項の事態が発生したときは、必要に応じて、委員会又は関係者の協力を求めることができる。

(事故及び災害時の措置)

第22条 使用責任者及び研究者は、事故若しくは災害の発生又はそのおそれのあるときは、直ちに、適切な措置を講じなければならない。

2 使用責任者及び研究者は、前項の事態が発生したときは、直ちに研究所で規定する方法で連絡しなければならない。

(細則)

第23条 この規程に定めるもののほか、この規程の実施に当たって必要な事項は、理事長が定める。

(規程の改定)

第24条 この規程は、指針の改正等の必要に応じて改定するものとする。

附 則

この規程は、平成19年10月1日から施行する。

この一部改正は、平成21年11月5日から施行する。

この一部改正は、平成22年7月26日から施行する。

ヒトES細胞使用計画承認申請書

平成 年 月 日

独立行政法人国立環境研究所理事長 殿

申請者（使用責任者）

氏名：

印

所属：

独立行政法人国立環境研究所ヒトES細胞使用研究倫理規程第10条の規程に基づき、下記のとおり、使用計画書の承認を申請します。

1. 使用計画の名称
2. 使用責任者名の氏名及び所属
3. 研究者の氏名及び所属
4. 使用の期間及び場所
5. 添付書類
 - (1) 使用計画届出書
 - (2) 使用計画書
 - (3) ユニット長承諾書
 - (4) その他参考となる事項

(注) 5の(4)以下については、添付書類の具体名を列挙すること。

様式1b*

使用計画届出書

平成 年 月 日

文部科学大臣 殿

独立行政法人国立環境研究所

理事長

印

ヒトES細胞の使用に関する指針第14条第1項により、別紙のとおり届け
出ます。

- * 注) 文部科学省への提出にあたっては、最新版の「ヒトES細胞使用計画の実施の手
引き（文部科学省）」にある様式番号に書き改めること

使用計画書

(1) 使用計画の名称

--

(2) 使用機関の名称及びその所在地並びに使用機関の長の氏名

使用機関の名称		
所在地		
使用機関の 長	ふりがな	
	氏名	
	職名	
使用機関の 長の 代行者	ふりがな	
	氏名	
	職名	

* 注) 文部科学省への提出にあたっては、最新版の「ヒト ES 細胞使用計画の実施の手引き (文部科学省)」にある様式番号に書き改めること

(3) 使用責任者の氏名、略歴、研究業績、教育研修の受講歴及び使用計画において果たす役割

使用責任者	ふりがな	
	氏名	
	職名	
略歴		
研究業績	論文	
	取扱い実績	
教育研修の受講歴		
使用計画において果たす役割		

(4) 研究者の氏名、略歴、研究業績、教育研修の受講歴及び使用計画において
果たす役割

研究者	氏名	
	職名	
略歴		
研究業績	論文	
	取扱い実績	
教育研修の受講歴		
使用計画において果たす役割		

研究者	氏名	
	職名	
略歴		
研究業績	論文	
	取扱い実績	
教育研修の受講歴		
使用計画において果たす役割		

(5) 使用の目的及びその必要性

目 的	
必 要 性	

(6) 使用の方法及び期間

方 法	
期 間	

(7) 使用に供されるヒトES細胞株の入手先及びヒトES細胞株の名称

入 手 先	
細 胞 名	

(8) 使用計画終了後のヒトES細胞（生殖細胞の作成を行う場合には、作成した生殖細胞の取扱いを含む。）の取扱い

--

(9) 使用機関の基準に関する説明

施設	概要	
	培養装置	
	管理体制	
規	則	
教育研修計画		

(10) 使用に供されるヒトES細胞が外国から提供される場合における当該ヒトES細胞の樹立及び譲受けの条件に関する説明

--

(11) その他必要な事項

--

(12) 事務担当者

事務担当者	ふりがな	
	氏 名	
	職 名	
	連 絡 先	

研究従事者変更履歴

使用計画の名称 環境化学物質による胎生プログラミングに及ぼす影響の検出法の開発									
研究における役割	研究者氏名	所属	役職	追加日	削除日	備考			
使用機関の長	大塚 柳太郎	国立環境研究所	理事長	平成20年10月10日	平成22年1月5日	文科省使用計画確認日			
使用責任者	曾根 秀子	国立環境研究所 環境リスク研究センター	主任研究員	平成20年10月10日	-	-			
研究者	今西 哲	国立環境研究所 環境リスク研究センター	NIESポスドクフェロー	平成20年10月10日	平成22年3月19日	平成21年3月31日退職			
研究者	永野 麗子	国立環境研究所 環境リスク研究センター	NIESポスドクフェロー	平成20年10月10日	平成23年1月17日	平成22年10月31日退職			
研究者	南齋(座波) ひろ子	国立環境研究所 環境リスク研究センター	高度技能専門員	平成20年10月10日	平成23年4月13日	平成23年3月31日退職			
使用機関の長	大垣 真一郎	国立環境研究所	理事長	平成22年1月5日	-	-			
研究者	赤沼 宏美	国立環境研究所 環境リスク研究センター	NIESアシスタントフェロー	平成22年1月12日	平成24年5月10日	平成24年3月31日退職			
研究者	南齋(座波) ひろ子	国立環境研究所 環境リスク研究センター	高度技能専門員	平成24年12月6日	-	-			
研究者	曾 勤	国立環境研究所 環境リスク研究センター	高度技能専門員	平成24年12月6日	-	-			

ヒト ES 細胞使用報告書

1) 使用計画の名称
環境化学物質による胎生プログラミングに及ぼす影響の検出法の開発
2) 使用機関の名称及びその所在地並びに使用機関の長の氏名（別添参照）
名称：独立行政法人国立環境研究所 所在地：〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2 使用機関の長：大塚柳太郎（平成 21 年 12 月 31 日まで）、 大垣 眞一郎（平成 22 年 1 月 5 日～） 職名：理事長
3) 使用責任者の氏名、略歴、研究業績及び使用計画において果たす役割
曾根秀子・環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室
4) 使用に関わる使用分担者の氏名・所属（別添参照）
今西 哲・環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室 永野麗子・環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室 南齋（座波） ひろ子・環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室 赤沼 宏美・環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室 曾 勤・環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室
5) 使用研究の概要
小児や老人などの脆弱な集団における化学物質の健康リスク評価において、様々な問題が蓄積している。その中で、動物実験データからヒトへの外挿における不確実性の問題の解決や次世代への影響の解明は、急務な課題の一つである。本研究では、ヒト胚性幹細胞（ES 細胞）を利用することにより、「胎生プログラミング」に着目した化学物質のヒト健康影響の評価手法を開発し、胎生期など感受性の高い時期における化学物質の曝露とその晩発影響を結びつける新しいヒト健康影響評価システムの基盤を作成する。これにより、化学物質曝露の被害を未然に防ぐことを可能とする健康影響予測システムの構築を可能とし、曝露・有害性情報の不足の解消に貢献する。具体的には、ヒトの胚

性幹 (ES) 細胞に化学物質を曝露し、得られた分化及び発達への細胞影響を計測する。将来的に、本研究で得られたデータ情報を化学物質ごとに分類して、影響の類型化を実施する予定である。

6) 使用の目的及びその必要性

使用の目的

本申請の目的は、ヒト ES 細胞を用いて、胎生プログラミングに影響を及ぼす環境化学物質の検出系の開発を行うことにある。

化学物質の曝露によるヒト ES 細胞の分化への影響を検出することによって得られたデータは、感受性の高い時期と考えられる小児、妊婦に対するヒトの健康リスク評価の基礎資料となりうる。さらに、本研究は、環境化学物質による胎児期や幼少期の曝露が関与する疾患の予防法の開発や、食事習慣を含めた生活環境の改善などの具体的な予防施策に結びつく。

背景：対象とする環境化学物質が多数存在するため、胎生プログラミングに影響を及ぼす環境化学物質の同定には迅速で経済的な検出系が望まれている。また、初期曝露による晩発影響といった経時的な変化の蓄積が本課題には存在すること、さらにヒトの脳の発達のような高次複雑系を反映するモデルを必要とするなどの観点から、ヒト ES 細胞を用いた環境化学物質の検出系が最も適しているものと考ええる。

胎生プログラミングの概念は、1992年に Baker によって糖尿病の発症原因が胎生期の栄養状態によるという「胎児原因説」が提唱され、その後、心血管系疾患や癌についても同様な原因論が提唱された (Baker, 1995)。今日では、後述する国際学会が開催されたように、単に栄養学の問題ではなく、胎児をとりまく環境中の化学物質も疾患の発症に寄与しているものと考えられており、胎生プログラミングが関与すると考えられる様々な疾患に対する有効な予防や治療法の開発を進める上で、胎生プログラミングに影響を及ぼす環境化学物質の同定は必要不可欠な課題となっている。

胎児及び幼少期は、化学物質に対する感受性の高い時期と考えられ、その後の生涯にわたる健康に影響を引き起こす可能性が懸念されている。環境化学物質のうち、鉛、水銀、PCB 類、砒素、トルエンなどでは、発達期の曝露がその後の脳に影響を及ぼすことが知られているが、これら以外の化学物質については、胎生期曝露の影響に関する評価が十分になされていない。一方で、注意欠陥・多動性障害、パーキンソン病や、アルツハイマー病などの中枢性疾患は、環境中の化学物質の胎生期曝露が発症や病態の進展に深く関わっている可能性があるとして指摘されている。それらの研究の緊急性、重要性が Grandjean によって Lancet (2006) に報告された。同じ頃に、Barlow らによっても、パーキンソン病を事例として、妊娠期における農薬などの環境化学物質に曝露されると、発症の閾値が下がるという動物実験や疫学調査の証拠が示された (Reproductive Toxicology, 2007)。さらに、胎生プログラミングと発達毒性に関する第 1 回国際カンファレンスが 2007 年に開催され、発生・発達期の環境化学物質曝露による健康影響についてフェロー宣言がまとめられた

(Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008)。このように、環境中の化学物質曝露による胎生プログラミング影響の問題は、世界的にも非常に注目され始めている。

ヒト ES 細胞を本研究で使用する科学的合理性

胎生及び発達プログラミングに影響を及ぼす環境化学物質の検出系の開発を行うため、我々は、マウス ES 細胞及び分化能を有する正常ヒト内皮細胞や乳腺上皮細胞を用いた実験系を構築し、化学物質の影響を評価した。これらの技術的、及び科学的な実績は、動物の ES 細胞やヒト組織幹細胞を用いた研究が十分行われているなど、計画している研究がヒト ES 細胞を用いる研究に進む段階に達していることを示している。

ヒト ES 細胞を本研究で使用する科学的必要性

本申請は、①曝露時期による感受性の差の問題、②ヒト健康リスク評価における不確実係数の問題の 2 点の理由から、マウス細胞の使用だけでは不十分であり、ヒト ES 細胞との比較研究を行い、より良い環境化学物質の検出系を確立するために行う。

ヒト ES 細胞を本研究で使用する科学的合理性の項で示したように、マウス ES 細胞や分化能を有するヒト正常細胞を用いた検出系を確立し、化学物質の影響を評価することができた。

しかしながら、胎生プログラミングのヒトでの影響を検索するには、未分化の時期に曝露し、胎生期、幼若期、成熟期といった時期を反映できる時系列での評価が必要である。分化能を有するヒト正常細胞の利用はできるが、未分化な状態と成熟細胞においては、生命維持システムが異なり、胎生プログラミングの影響の検出とは異なってしまう。

また、化学物質のヒトに対する生体影響を算定するいわゆるリスク評価において、動物実験から得られた影響レベルからのヒトへの外挿過程がある。この外挿には、様々な不確定要因が含まれる。実際、動物がヒトのモデルにならない事例が少なからず存在するため、ヒト由来の組織や細胞を用いて化学物質の影響を調べることが望まれている。

① 曝露時期による感受性の差の問題

胎生の時期は、様々な外的因子や内的因子に対する感受性が成熟時期とは異なり、曝露の時期や観察する指標により多様な影響が検出される。その一例として、ビタミン A (RA) は、実験動物やヒトにおいて胎児の奇形を及ぼすことが知られているが、胎生期における曝露の時期及び曝露量によって、多様な催奇形性が誘発されることが報告されている。表 2 にラットの例を示したが、出生後の発達期の影響は、催奇形性より低濃度で現れることが知られている。このような曝露の時期と濃度による多様な影響を反映できるモデルは ES 細胞以外にはない。

表1 RAの曝露量や時期による催奇形性や神経行動への影響の多様性

催奇形性: 胎仔への影響						
動物	投与量	投与時期				文献
		GD 8-10	GD 11-13	GD 14-16	PND 3-5	
ラット(母体)	10 mg/kg/day	重篤な影響なし	重篤な影響なし	重篤な影響なし	重篤な影響なし	Holson RR et al., 1999
ラット(胎仔)	10 mg/kg/day	重篤な影響なし	ほとんど死産	死産あり、生存ラットでは、脳重量、小脳重量の低下		
ラット(若い仔; PND28)	2.5 mg/kg/day	生存ラットでは、脳重量、小脳重量の低下 脳幹のみ影響				
出生後の発達過程にける影響						
動物	投与量	症状			文献	
ラット(母体)	3 mg/kg/day	影響なし			Holson RR et al., 1997	
ラット(若い仔; PND28)	3 mg/kg/day	体重減少	神経発達行動の低下	眼球、骨格異常		

② ヒト健康リスク評価における不確実係数の問題

化学物質のヒトに対する生体影響を算定するいわゆるリスク評価において、信頼しえるヒトのデータがない場合は、動物実験のデータをヒトへ外挿することにより数値を算出するのが一般的に行われる。行われている手法では、最大無毒性量を不確実係数(Uncertainty Factor: UF)で割り、ヒトの影響の下限値としていることが多い。このUFは、種内(個体)差・種間差・低濃度域外挿・曝露シナリオ・毒性の種類の変異・データ信頼性の6項目を各々10段階評価で行うため、UFは最大 10^6 となる。ヒト健康リスク管理上、影響の算定には、このUFをいかに低くできるかが重要課題であり、観察された有害影響の発現メカニズムがヒトと共通であることが一定の確度をもっていえるかどうか検証の上、慎重に行うべきとされている。このうち、種間差の問題が、予測が難しく、最も解決困難な問題である。過去の事例では、ダイオキシンのクロルアクネ、サリドマイドの奇形などで知られている。以下、その例をダイオキシン及びサリドマイドについて示す。

ダイオキシンの例：非発がん性の毒性については、ヒトにおいて最も特徴的な影響がクロルアクネの発症である。実験動物では、サルにおいてのみ同様な症状が確認できている。妊娠母体への曝露による胎仔の死亡率のNOAEL(最大無毒性量)及びLOAEL(最小毒性量)でみると、サルで22及び111 ng/kg/day、ラットで30及び500 ng/kg/dayとなっておりLOAELで約5倍の差がある。マウスにいたっては、500 ng/kg/dayでも胎仔の死亡率の有意な増加は観察されていない。一方、視点を変えて、各ヒト及び動物種での母親(獣)への曝露による胎児(胎仔)及び子どもへの最小毒性量で比較してみると、感受性が最も高かったヒトと最も低かったマウスで30倍以上の開きがあった(表2)。

表2 TCDDの最小毒性量の種差

種	最小毒性量における影響	母親(獣)における曝露量	文献	比較
ヒト	神経発達の遅延	パックスグランドレベル <15 ng/kg	Duch studies; Huisman et al., 1995	1
サル	対象学習の遅延	19 ng/kg	Schantz and Bowman, 1989	1
ラット	開眼促進	50 ng/kg	Gray et al., 1997	3
マウス	水腎症	500 ng/kg	Silkworth et al., 1989	33

サリドマイドの例：サリドマイドが、ヒトに対して特徴的な四肢欠損の催奇形性を示すことは広く知られている。大きな種差の違いが予測できなかったため大きな惨事が起こった。この催奇形性のメカニズムは未だ明らかではない。その最大の理由は、マウスやラットに対しては、ほとんど毒性を示さないため、メカニズム研究が進んでいないことにある。Wistar ラットに 50mg/kg 投与した場合に、胎仔の成長抑制が見られることから、ラットの NOAEL は 25mg/kg とされている。マウス A 系統では、31mg/kg である。ウサギはサリドマイドに対して感受性のある実験動物であるが、実験結果からの推定 NOAEL は 12mg/kg とされている。一方、サルにおける NOAEL は 0.625mg/kg 未満とされ、サリドマイド被害者の処方量の 1-40 mg/kg/day より低い。サルと他の動物を比較してもその差は、10 倍以上である (表 3)。

表3 サリドマイドの推定 NOAEL の種間差

	推定NOAEL(m/k/d)	証拠	サルとの比較
マウス	31	31mg/kg/dayで低頻度の催奇形性	50
ラット	25	50mg/kg/dayで最小の発育遅延	42
ウサギ	12	12mg/kg/dayで最小の骨格の異形	20
サル	<0.625	0.625mg/kg/dayで重篤かつ典型的な催奇形性	1

出典: Newman, et al., 1993

ヒト ES 細胞使用の最終的な目的

未分化な時期における環境化学物質の曝露がその後の発達に及ぼす影響の検出系を開発し、胎生プログラミングに影響を及ぼす環境化学物質を迅速に多数検出することができれば、これらの環境化学物質に関する影響データを整備し、感受性の高い時期と考えられる小児や妊婦などに対して、ヒトの健康リスクを判定する際の資料となる評価システムを構築することが可能となる。このことが、環境化学物質による胎児期や幼少期の曝露が関与する疾患の予防法の開発や、食事を含めた生活環境の改善の具体的な施策につながる。

7) 使用の方法及び期間

使用の方法

本研究では、発達段階にある胎生期曝露とその晩発影響を、ヒト ES 細胞の分化への影響としての観点から実験手法を構築するとともに、得られる遺伝子発現および細胞表現型の情報を統合し解析することで、胎生プログラミングへの影響を解析する新たな検出法を開発するものである（図 1 参照）。従って、指針第 4 5 条で定める禁止事項について（すなわち、ヒト ES 細胞を使用して作成した胚のヒト又は動物の体内への移植その他の方法によりヒト ES 細胞から個体を作成すること、ヒト胚へのヒト ES 細胞を導入すること、ヒト胎児へヒト ES 細胞を導入すること、ヒト ES 細胞から生殖細胞を作成すること）は、行わない。

ヒト ES 細胞に、分化誘導剤を曝露し、神経系及び血管内皮系細胞への分化を誘導する。各標的細胞の分化マーカーを利用して、マルチチャンネル細胞画像解析装置により各分化細胞を認識させ、同時に各細胞の形態変化指標を解析する。それとともに、mRNA 発現、DNA メチル化を測定する。

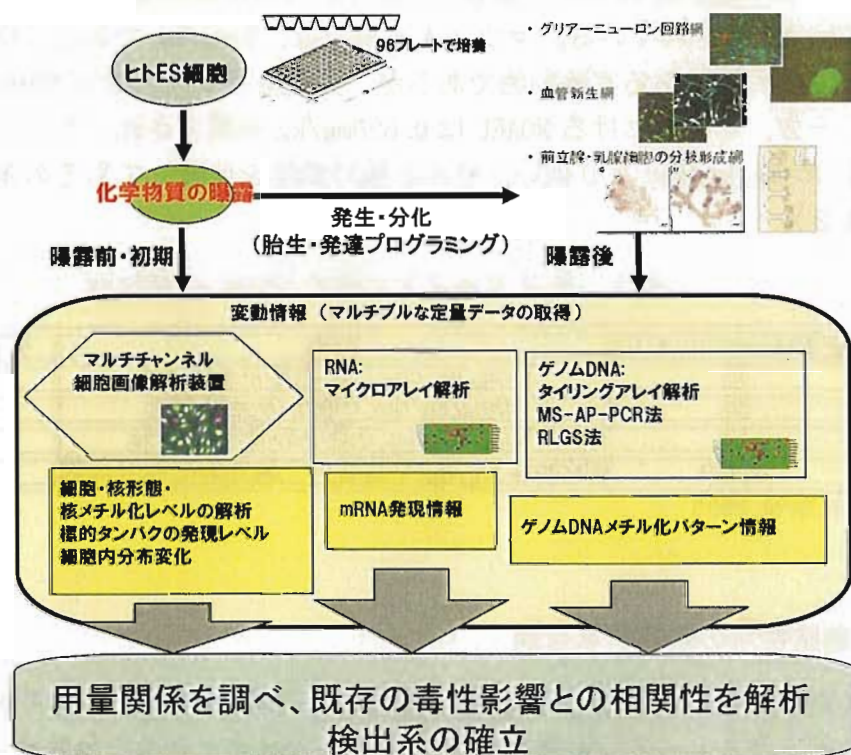


図 1. 研究方法の全体説明図

具体的には、マウス ES 細胞の時の培養プロトコールを基本に、ヒト ES 細胞を 37°C 及び 5%CO₂ の環境条件下で、目的に適合した培養液及び基底膜でコートした 6-96 穴プレート上で培養し、培養初期に分化誘導剤を添加し、適切な期間培養して細胞集塊 (EB) を形成させる。その後、血管内皮及び神経系への分化に適したプレート上に再播種し血管内

皮及び神経系に分化させる。(図2参照) この分化プロトコールにおいて、分化誘導剤曝露後、もしくは、分化誘導剤の無存在下に各被験物質を添加し、一定時間曝露させる。その後、EBの形成時及び分化細胞において十分に分化マーカーが発現している時期の複数ポイントで細胞を採取し、RNA及びDNAを抽出する。同時に残りの細胞は固定液で固定し、細胞の形態計測に使用する。本研究計画に使用する化学物質は、Grandjean P (Lancet 2006) に示した神経毒性既存物質および高懸念物質から10化合物程度選定し、表5に示した各核内受容体作用剤との比較を行う(表5)。

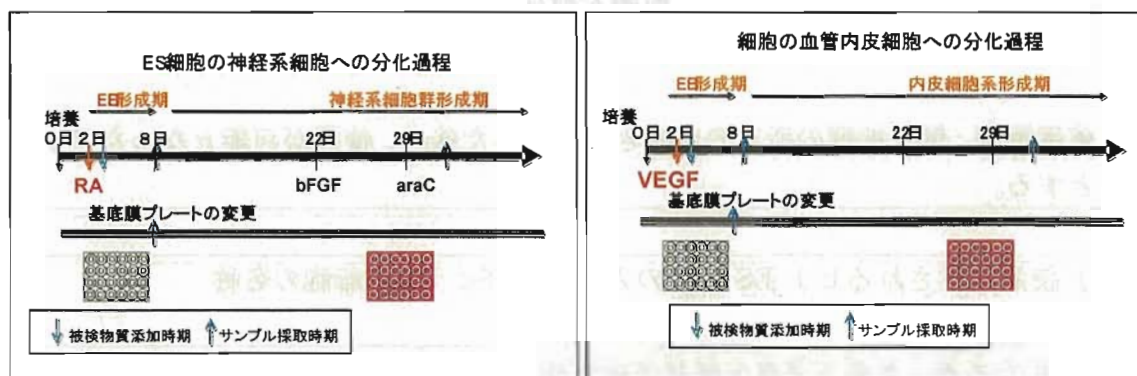


図2. ES細胞の神経系細胞(左)及び血管内皮系細胞(右)への分化実験の概略図

(注: タイムスパンはマウスの例である。ヒトESでは必ずしもこのタイムスパンと一致しない可能性がある)

表5 被験物質の候補例

核内受容体	核内受容体作用剤
AhR	TCDD, omeprazole
RXR	Retinoic acid
PXR	Rifampicin, nicotine
GR	dexamethazone
TR	3,5,3',5'-tetraiodo-L-thyronine(T(4), 1), 3,5,3'-triiodo-L-thyronine(T(3), 2), tetrabromobisphenol A
その他	carbaryl, permethrin
未知物質	未定

(ここに掲げた物質名は候補物質であり、変更もありうる。)

表6 実施化学物質

略称	物質名
MeHg	塩化メチル水銀
4OHPCB187	2,2',3,4',5,5',6-heptachloro-4-biphenylol
BDE47	2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether
BPA	ビスフェノールA (4,4'-Isopropylidenediphenol, 2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane
Tha	サリドマイド (2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)isoindole-1,3-dione)

年次計画

Stage-1 (承認日から2年間) 胎生プログラミング異常を検出する系の確立

化学物質の影響をみるため、フィーダー細胞のない、無血清培地での培養条件、分化誘導剤及び被験物質の添加条件などの各種実験条件の確立を行う。各分化段階に応じた分化の指標（抗体）を用いて蛍光免疫化学的に細胞を標識し、分化度を確認する。同時に解析のための材料（RNA, DNA の抽出、細胞の固定）を準備する。

Stage-2（3-4年目）

Stage-1 で確立したアッセイ系に核内受容体の代表的作用剤（表5、6参照）を中心に種々の被験物質を曝露し、影響を調べる。

Stage-3（5年目）

引き続き、種々の被験物質の影響を評価する。

使用期間：関係機関の所定の手続きが終了した後に、使用が可能となった日から5年間とする。

8) 使用に供されるヒト ES 細胞の入手先及びヒト ES 細胞の名称	
入手先の名称	京都大学再生医科学研究所
入手先の機関 長 氏 名	中辻憲夫
入手先の所在 地	〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53 電話番号 075-751-3802
ヒト ES 細胞 の 名 称	KhES-1, KhES-2 及び KhES-3
樹 立 日 時	平成 15 年 11 月
そ の 他	
9) 使用完了後のヒト ES 細胞及び分化細胞の取扱い	
<p>供与される予定の細胞株 KhES-1, KhES-2 及び KhES-3 は研究計画の終了後、廃棄するものとする。</p> <p>廃棄は、オートクレーブにて 121℃で 15 分間滅菌後、廃棄する。</p> <p>ただし、分化細胞は、実験終了後、独立行政法人国立環境研究所ヒト ES 細胞使用研究倫理規程 13 条にもとづいて保管する。</p>	

10) 使用研究の成果

1. ヒト ES 細胞を利用したメチル水銀の毒性メカニズムの解明

メチル水銀は胎児性水俣病の原因物質であることが知られているが、ヒトにおいて病態を引き起こすメカニズムは明らかになっておらず、さらなる研究が必要とされていた。メチル水銀の毒性メカニズムを解明するために、ヒト ES 細胞やマウス ES 細胞から成熟した神経細胞を分化させる培養方法と、数理工学的手法を利用した解析方法により、メチル水銀に対するヒトとマウスの感受性を比較した。ES 細胞が神経分化する初期の段階で、メチル水銀を曝露すると、神経細胞への分化は、マウスよりヒトにおいて強く抑制されることがわかった。

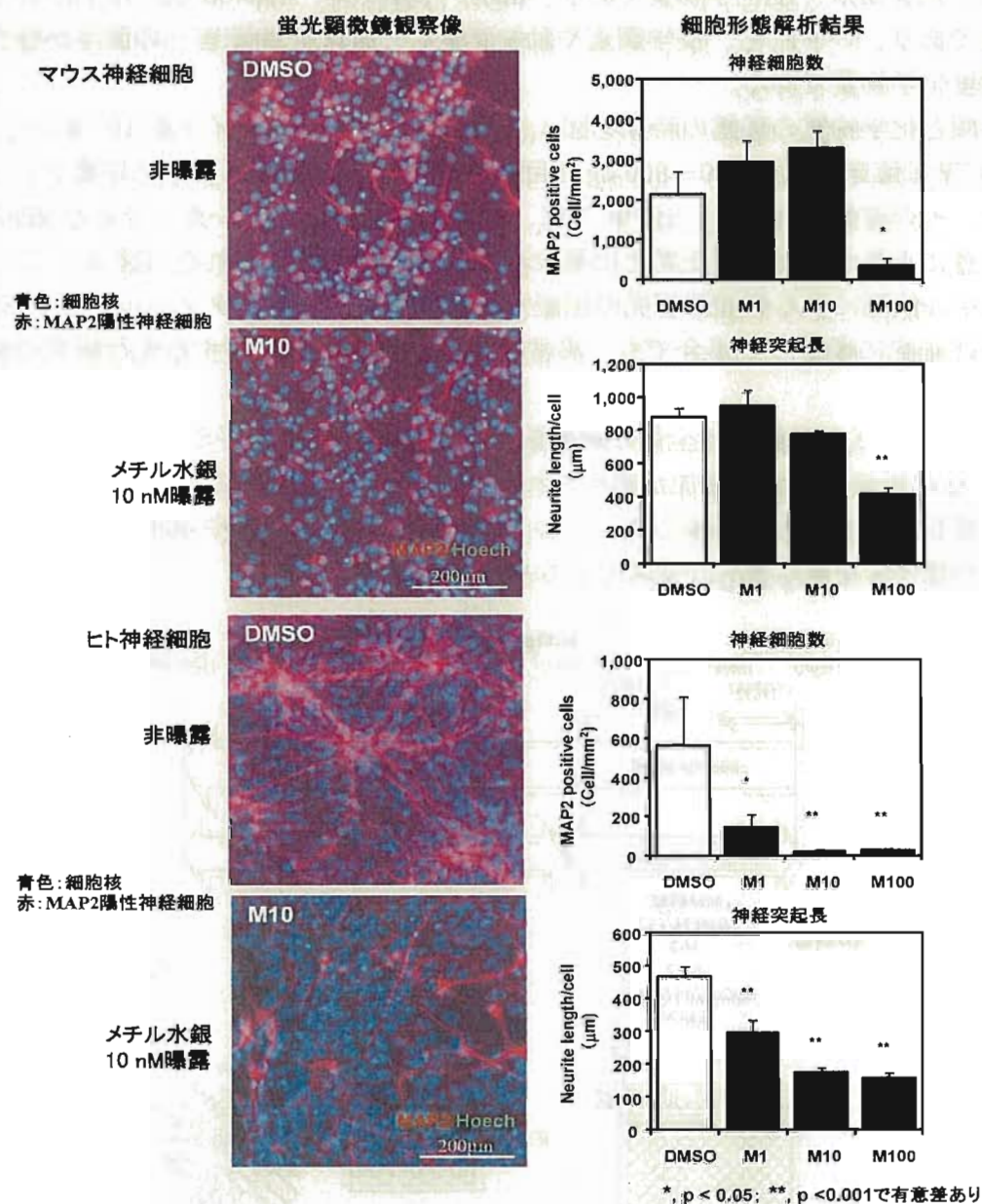


図3 ヒトとマウスのES細胞におけるメチル水銀の影響の比較

青色で染色された核の数が細胞数に相当し、赤色で染色された線維状の突起が神経突起を示す。ヒト神経細胞では赤色染色の細胞と線維状突起が著しく減少している。

2. 胚様体形成時期の化学物質曝露による環境化学物質の神経分化への影響

調べた化学物質は、陽性対照としての Thal、BPA、BDE47、および 40H-CB 187 の 4 種である (表 6)。サリドマイドは、四肢の発達不全を主症状とする催奇形性薬剤として知られている。1999 年には日本国内では約 309 名の「海豹肢症」の子供が生まれサリドマイドの危険性が明らかとなった。この薬害にもかかわらず近年では血管新生阻害作用を利用した多発性骨髄腫に対する抗がん剤として国内外で使用されている。また海外ではハンセン病の鎮痛剤、HIV ウイルスの増殖抑制剤などとしても使用されている功罪両面を併せ持つ臨床上的薬剤である。母親が妊娠 20~24 日目に服用した場合に生まれた子供の一部は、頭外側部の異常と共に自閉症を併発している事が報告されている。ビスフェノール A は、内分泌かく乱化学物質であり、BDE47 は難燃剤、40H-CB 187 は PCB の主たる代謝物質であり、いずれも、疫学調査や動物実験から神経発達障害への関与が懸念されている環境化学物質である。

実験手順と化学物質の曝露の時期を図 4 に示した。サリドマイドを $10^{-7}M$ から $10^{-5}M$ 濃度 ($10^{-6}M$ は臨床用量の 400-800 mg/1 回投薬量に相当) になるように培養プレートに添加した。その結果、 $10^{-6}M$ と $10^{-5}M$ では、有意に神経特異的マーカーである MPA2 陽性細胞が有意に上昇しており、正常とは異なる過剰な増殖が認められた (図 5)。このことは、妊娠中の飲酒による発達障害児の出産で問題となっているエタノールをヒト ES 細胞由来の神経細胞に曝露した場合でも、異常な増殖が認められたとする先行研究の結果と一致する。

BDE47 においても、曝露群で全体の細胞数の有意な増加やドーパミンニューロンを示す TH 陽性細胞の面積の有意な増加が認められた (図 5)。この結果は、BDE47 が神経分化に対して影響を及ぼすことを示唆した。しかし、ビスフェノール A や 40HCB187 では、我々が用いた指標では有意な変化が認められなかった (図 5)。

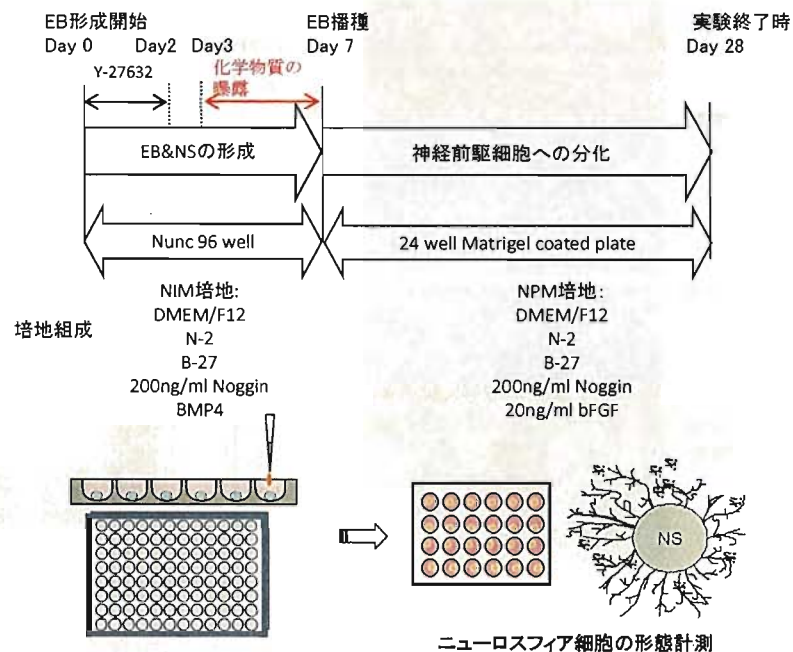


図 4 環境化学物質の神経発生毒性影響試験の実験手順

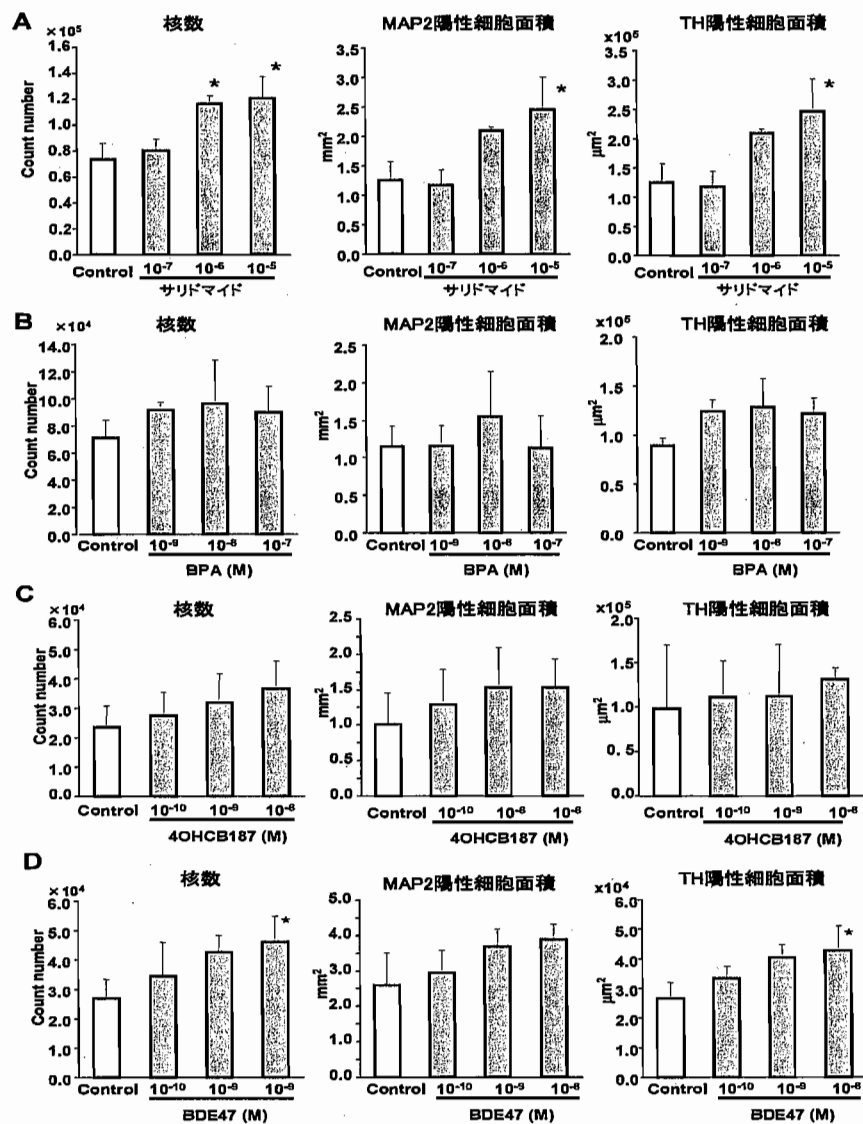


図5 環境化学物質の曝露による神経細胞の形態指標の変化
 A: サリドマイド、B: BP、C: 水酸化 PCB (4OHCB-187)、D: BDE47

3. 胚様体形成時期の化学物質曝露による環境化学物質の血管分化への影響

血管内皮細胞への分化への影響を、内胚葉が形成され、血管内皮前駆細胞が形成される時期に化学物質(サリドマイド及びビスフェノールA)を曝露させることで調べた。サリドマイドは、血管内皮の血管腔形成を阻害し、血管新生を阻害することが知られているので、分化阻害作用を期待して調べたが、神経の場合に反して影響は認められなかった。同様に、ビスフェノールAの曝露に関しても血管内皮細胞への分化には抑制影響が示されなかった。むしろ、高濃度で、有意な細胞増殖能が認められた。ビスフェノールAは、乳腺や前立腺上皮細胞において細胞増殖能があることが知られているが、EB形成から血管内皮細胞への分化時期においてもその細胞増殖能があることが今回の結果から解った。

4. まとめと今後の課題

分化の初期段階における環境化学物質の曝露がその後の発達に及ぼす影響の検出系を開発し、メチル水銀でのマウスとヒトとの違いを示した。さらに、迅速アッセイ系を開発して、4種の化学物質の曝露の影響を調べた。今後、胎生プログラミングの検出のため、マイクロアレイを用いた遺伝子発現やエピジェネティクス解析を実施したいと考えている。これらの環境化学物質に関する影響データを整備し、感受性の高い時期と考えられる小児や妊婦などに対して、ヒトの健康リスクを判定する際の資料となる評価システムを構築することを目指す。このことが、環境化学物質による胎児期や幼少期の曝露が関与する疾患の予防法の開発や、食事を含めた生活環境の改善の具体的な施策につながると考えている。

また、iPS細胞との比較検討も必要な課題として念頭においている。そのためには、研究計画の終了が平成25年10月に迫っているため、計画の修正と延長を考えている。

ヒト ES 細胞使用計画書

1) 使用計画の名称	
環境化学物質による胎生プログラミングに及ぼす影響の検出法の開発	
2) 使用機関の名称及びその所在地並びに使用機関の長の氏名	
名称：独立行政法人国立環境研究所 所在地：〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2 使用機関の長：大塚柳太郎 職名：理事長	
3) 使用責任者の氏名、略歴、研究業績及び使用計画において果たす役割（別添）	
使用責任者氏名・所属	曾根秀子・環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室
4) 使用分担者の氏名、略歴、研究業績及び使用計画において果たす役割（別添）	
使用に関わる使用分担者の氏名・所属	今西 哲・環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室 永野麗子・環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室
5) 研究者の氏名、略歴、研究業績及び使用計画において果たす役割（別添）	
使用に関わる研究者の氏名・所属	座波ひろ子・環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室
ES 細胞の取扱い実績 曾根は、平成 17 年 9 月からマウス ES 細胞を用いた実験研究を行うために国立環境研究所内で専用実験機器、スペースの確保・充実を行い、同年 12 月からマウス ES 細胞株（E14tg2a, 理化学研究所筑波研究所バイオリソースセンター阿部訓也博士より分譲）を用いた研究を開始、平成 18 年 3 月には B6G2 株（RIKENCELL BANK）での研究を開始した。これらの研究によって、神経系への分化に対する外因性物質による ES 細胞分化への影響評価を行って、外因性物質の培地への添加濃度による神経系細胞への分化程度が異なるという成果を得た。さらに、平成 19 年 5 月より無フィーダー細胞、無血清条件で ES 細胞を維持の確立に務めるとともに、血管内皮細胞系への分化過程への影響についても評価系を確立し、血管形成抑制作用を持つ化学物質を見出した。従って、平成 17 年 12 月	

より平成 20 年 5 月現在、2 年 5 ヶ月の実績を有する。

6) 使用の目的及びその必要性

使用の目的

本申請の目的は、ヒト ES 細胞を用いて、胎生プログラミングに影響を及ぼす環境化学物質の検出系の開発を行うことにある。

化学物質の曝露によるヒト ES 細胞の分化への影響を検出することによって得られたデータは、感受性の高い時期と考えられる小児、妊婦に対するヒトの健康リスク評価の基礎資料となりうる。さらに、本研究は、環境化学物質による胎児期や幼少期の曝露が関与する疾患の予防法の開発や、食事習慣を含めた生活環境の改善などの具体的な予防施策に結びつく。

背景：対象とする環境化学物質が多数存在するため、胎生プログラミングに影響を及ぼす環境化学物質の同定には迅速で経済的な検出系が望まれている。また、初期曝露による晩発影響といった経時的な変化の蓄積が本課題には存在すること、さらにヒトの脳の発達のような高次複雑系を反映するモデルを必要とするなどの観点から、ヒト ES 細胞を用いた環境化学物質の検出系が最も適しているものとする。

胎生プログラミングの概念は、1992 年に Baker によって糖尿病の発症原因が胎生期の栄養状態によるという「胎児原因説」が提唱され、その後、心血管系疾患や癌についても同様な原因論が提唱された (Baker, 1995)。今日では、後述する国際学会が開催されたように、単に栄養学の問題ではなく、胎児をとりまく環境中の化学物質も疾患の発症に寄与しているものと考えられており、胎生プログラミングが関与すると考えられる様々な疾患に対する有効な予防や治療法の開発を進める上で、胎生プログラミングに影響を及ぼす環境化学物質の同定は必要不可欠な課題となっている。

胎児及び幼少期は、化学物質に対する感受性の高い時期と考えられ、その後の生涯にわたる健康に影響を引き起こす可能性が懸念されている。環境化学物質のうち、鉛、水銀、PCB 類、砒素、トルエンなどでは、発達期の曝露がその後の脳に影響を及ぼすことが知られているが、これら以外の化学物質については、胎生期曝露の影響に関する評価が十分になされていない。一方で、注意欠陥・多動性障害、パーキンソン病や、アルツハイマー病などの中枢性疾患は、環境中の化学物質の胎生期曝露が発症や病態の進展に深く関わっている可能性があるとして指摘されている。それらの研究の緊急性、重要性が Grandjean によって Lancet (2006) に報告された。同じ頃に、Barlow らによっても、パーキンソン病を事例として、妊娠期における農薬などの環境化学物質に曝露されると、発症の閾値が下がるという動物実験や疫学調査の証拠が示された (Reproductive Toxicology, 2007)。さらに、胎生プログラミングと発達毒性に関する第 1 回国際カンファレンスが 2007 年に開催され、発生・発達期の環境化学物質曝露による健康影響についてフェロー宣言がまとめられた (Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008)。このように、環境中の化学物質曝露による胎生プログラミング影響の問題は、世界的にも非常に注目され始めている。

ヒト ES 細胞を本研究で使用する科学的合理性

胎生及び発達プログラミングに影響を及ぼす環境化学物質の検出系の開発を行うため、我々は、マウス ES 細胞及び分化能を有する正常ヒト内皮細胞や乳腺上皮細胞を用いた実験系を構築し、化学物質の影響を評価した。これらの技術的、及び科学的な実績は、動物の ES 細胞やヒト組織幹細胞を用いた研究が十分行われているなど、計画している研究がヒト ES 細胞を用いる研究に進む段階に達していることを示している。

その具体的な科学的合理性を以下に説明する。

1. マウス ES 細胞から神経細胞系列への分化に対するレチノイン酸 (RA) の影響 (永野、曾根担当) :

化学物質や薬剤による細胞分化過程への広範な影響を、癌細胞株を含む分化細胞を用いた研究で捉えることは極めて困難である。この研究によって、胎生初期段階で化学物質による曝露を受けた際には、その後の成体組織への分化にも影響を及ぼす可能性があることを示すことが出来た。

RA は、ビタミンAの代謝物として多様な生理活性を有し、催奇形性を誘発することが古くから知られている。加えて近年では、マウスやヒトの ES 細胞に対する分化誘導剤として多くの研究で使用されている。

申請者は、まずマウス ES 細胞を用いて、培養液から分化抑制因子を除去して培養 2 日目に RA を添加し、その影響を調べた。培養 7 日目の胚様体 (EB) に、神経選択的マーカーで免疫細胞化学染色を施すと、面積あたりの EB 数、EB の真円率及び総面積が、RA の添加濃度依存的に減少した (図 1)。

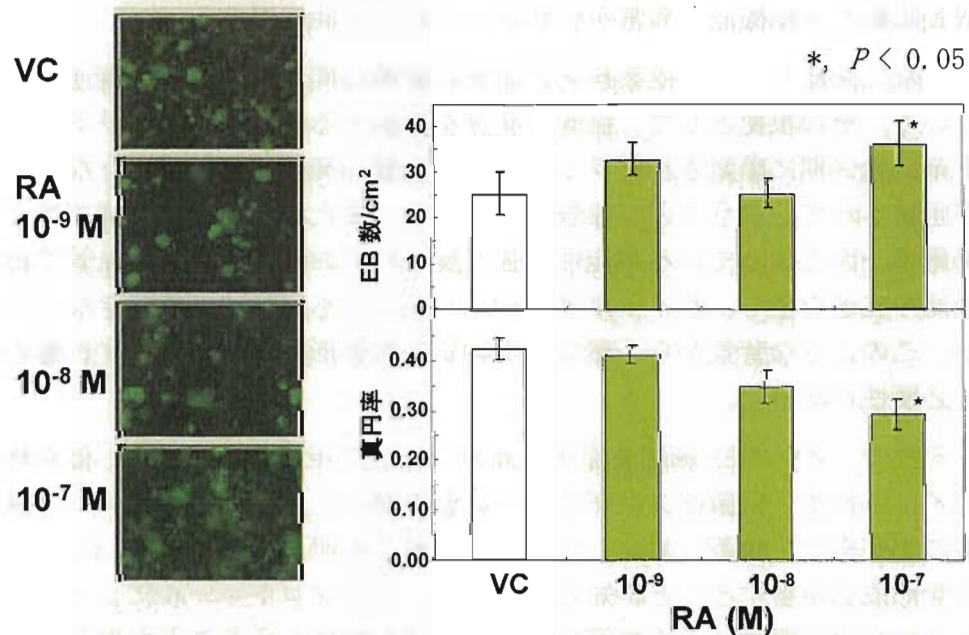


図 1 RA 曝露によるマウス EB 形成への影響

更に、その後の成熟神経細胞分化への影響を評価するために、この EB 細胞を神経系選択基底膜プレートに播種し、3 週間の長期培養を行った。その結果、RA の濃度によって、神経系細胞とアストロサイトの存在比の明らかな相違が認められ、成熟神経系への分化への影響が示唆された (図 2)。

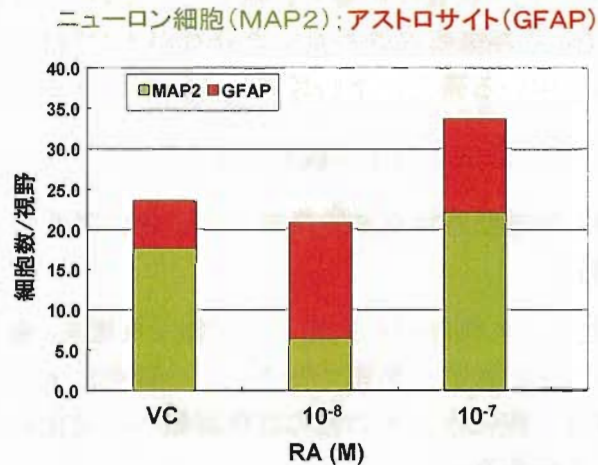


図 2 RA 曝露によるマウス ES 細胞の神経系分化への影響

2. サリドマイド、フマギリン及びペルメトリンの血管内皮細胞系への分化に及ぼす影響 (今西、曾根担当) : 発達期の脳は成長を続けており、それに伴って血管も伸長や分岐を繰り返している。この時期に化学物質に曝露されると、血管の発達異常による、脳の成長阻害や中枢機能の異常が引き起こされる可能性がある。

これに関連して、中枢系疾患と血管の発達の間には、密接な関連が有ることが知られている。その根拠として、血管の発達を抑制する作用をもつサリドマイドや、ステロイド剤に胎仔期に曝露されたラットでは、血管の発達不全が原因となって、中枢系の発達が阻害されてしまうことが報告されている。またパーキンソン病では、農薬への慢性的曝露が一因となっている可能性が強く疑われており、患者の脳血管は形態的な異常と透過能の亢進を呈し、サイトカインやホルモンにも正常に応答できないことが知られている。このような背景から、環境化学物質の血管形成過程に及ぼす影響の評価系を開発する必要性があった。

そこで、マウス ES 細胞を血管系細胞に分化させる系を確立し、催奇形性誘導剤サリドマイドと抗生・抗菌剤フマギリンの影響を調べた。胚様体 (EB) から誘導される管腔構造の出芽率は、顕著に減少した (図 3, 表 1 参照)。サリドマイドおよびフマギリンは、血管形成を阻害することが知られており、このプロトコールによって、血管形成の初期での化学物質曝露による血管形成への影響を評価しうる事が確かめられた。そこで、広く一般に用いられている殺虫剤ペルメトリンをこのプロトコールによって評価したと

ころ、血管系への分化指標となる管腔構造の出芽率が減少したことから、血管形成を抑制する可能性が示された。市販のヒト正常成熟血管内皮細胞を用いた実験や(図4参照)、妊娠期マウスに経口投与し胎仔への影響を調べた実験でも、血管の分岐数の増加など血管形成過程の異常を示す結果が得られ(図5参照)、マウスES細胞を用いた試験方法がヒト正常培養細胞やマウス体内での現象を反映することが確かめられた。



図3 EBからの血管様構造の出芽の様子と化学物質曝露の影響の例

表1 各薬剤のEBから血管様細胞の血管様細胞の移動性及び出芽に及ぼす影響

処置	血管様細胞の移動性	出芽率
無処置群	0/7 (0%)	1/6 (16.7%)
溶媒(DMSO)群	0/11 (0%)	5/8 (62.5%)
フマギリン 10 ⁻⁷ M	0/5 (0%)	0/4 (0%)
サリドマイド 10 ⁻⁷ M	4/10 (40%)	0/7 (0%)
ペルメトリン 10 ⁻⁷ M	3/8 (37.5%)	3/9 (33.3%)

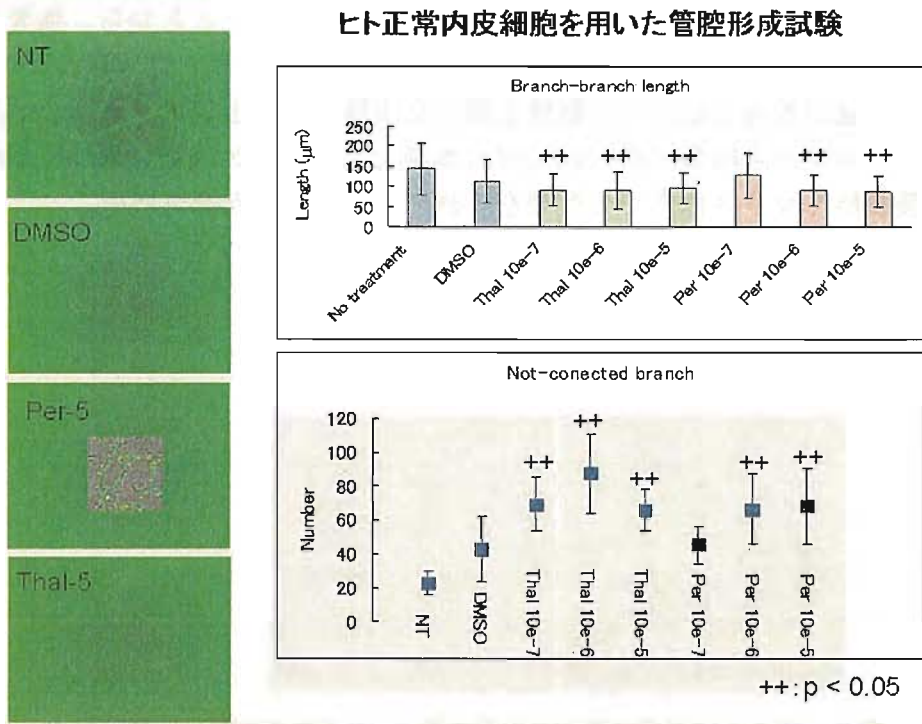


図4 ヒト正常血管内皮細胞の管腔形成試験

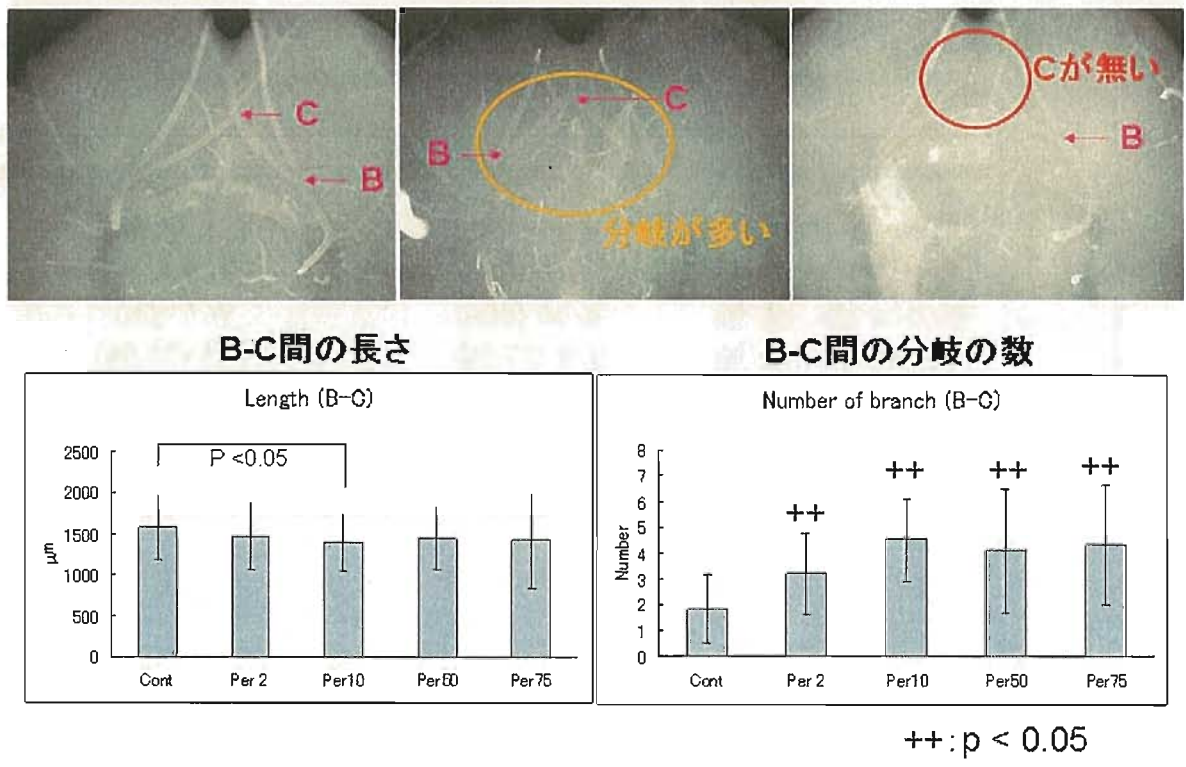


図5 マウス動物実験における結果

3. 正常ヒト乳腺上皮細胞におけるビスフェノール A の初期曝露と晩発影響 (曾根、座波): 工業化学製品から環境中に遊離されるビスフェノール A によるマウスおよびラットの周産期曝露によって、引き続き発達期に乳腺上皮細胞が発がん物質曝露を受けると発癌率が上昇することが知られている。しかし、ヒトにおける影響は不明である。そのため、ヒトにおける影響を予測するためのモデルの必要性が指摘されていた。我々は、正常ヒト乳腺上皮細胞にビスフェノール A を樹立から 8 世代目に 1 世代だけ曝露させ、その後 5 世代培養を継代させたところ、初期曝露の濃度に依存して細胞増殖が増大し、細胞の老化が促進されることを確認した (図 6 参照)。

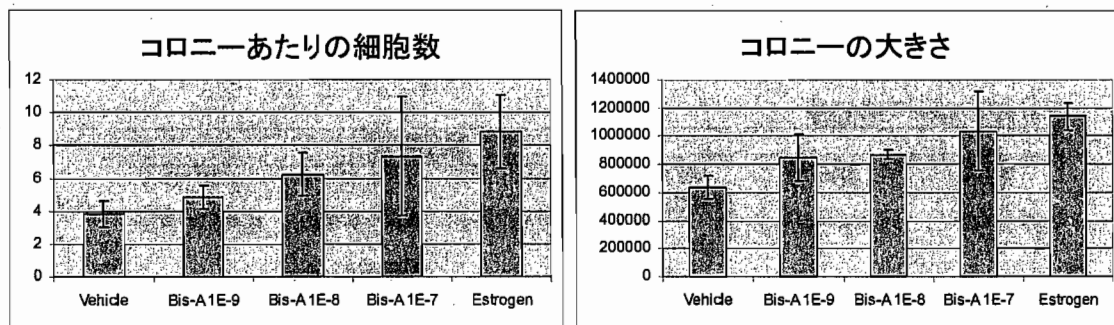


図 6 正常ヒト乳腺上皮細胞の 3 次元培養における BPA の細胞増殖能への影響。8 世代目に BPA を 1 世代間だけ曝露させ、その後 13 世代目 (約 3 ヶ月後) のコロニー形成能。

ヒト ES 細胞を本研究で使用する科学的必要性

本申請は、①曝露時期による感受性の差の問題、②ヒト健康リスク評価における不確実係数の問題の 2 点の理由から、マウス細胞の使用だけでは不十分であり、ヒト ES 細胞との比較研究を行い、より良い環境化学物質の検出系を確立するために行う。

ヒト ES 細胞を本研究で使用する科学的合理性の項で示したように、マウス ES 細胞や分化能を有するヒト正常細胞を用いた検出系を確立し、化学物質の影響を評価することができた。

しかしながら、胎生プログラミングのヒトでの影響を検索するには、未分化の時期に曝露し、胎生期、幼若期、成熟期といった時期を反映できる時系列での評価が必要である。分化能を有するヒト正常細胞の利用はできるが、未分化な状態と成熟細胞においては、生命維持システムが異なり、胎生プログラミングの影響の検出とは異なってしまふ。

また、化学物質のヒトに対する生体影響を算定するいわゆるリスク評価において、動物実験から得られた影響レベルからのヒトへの外挿過程がある。この外挿には、様々な不確定要因が含まれる。実際、動物がヒトのモデルにならない事例が少なからず存在するため、ヒト由来の組織や細胞を用いて化学物質の影響を調べることを望まれている。

① 曝露時期による感受性の差の問題

胎生の時期は、様々な外的因子や内的因子に対する感受性が成熟時期とは異なり、曝露の時期や観察する指標により多様な影響が検出される。その一例として、ビタミンAは、実験動物やヒトにおいて胎児の奇形を及ぼすことが知られているが、胎生期における曝露の時期及び曝露量によって、多様な催奇形性が誘発されることが報告されている。表2にラットの例を示したが、出生後の発達期の影響は、催奇形性より低濃度で現れることが知られている。このような曝露の時期と濃度による多様な影響を反映できるモデルはES細胞以外にはない。

表2 RAの曝露量や時期による催奇形性や神経行動への影響の多様性

催奇形性: 胎仔への影響		投与時期				文献
動物	投与量	GD 8-10	GD 11-13	GD 14-16	PND 3-5	
ラット(母体)	10 mg/kg/day	重篤な影響なし	重篤な影響なし	重篤な影響なし	重篤な影響なし	Holson RR et al., 1999
ラット(胎仔)	10 mg/kg/day	重篤な影響なし	ほとんど死産	死産あり、生存ラットでは、脳重量、小脳重量の低下		
ラット(若い仔; PND28)	2.5 mg/kg/day		生存ラットでは、脳重量、小脳重量の低下	脳幹のみ影響		

出生後の発達過程にける影響			症状	文献
動物	投与量			
ラット(母体)	3 mg/kg/day	影響なし		Holson RR et al., 1997
ラット(若い仔; PND28)	3 mg/kg/day	体重減少	神経発達行動の低下 眼球、骨格異常	

② ヒト健康リスク評価における不確実係数の問題

化学物質のヒトに対する生体影響を算定するいわゆるリスク評価において、信頼しえるヒトのデータがない場合は、動物実験のデータをヒトへ外挿することにより数値を算出するのが一般的に行われる。行われている手法では、最大無毒性量を不確実係数(Uncertainty Factor: UF)で割り、ヒトの影響の下限値としている場合が多い。このUFは、種内(個体)差・種間差・低濃度域外挿・曝露シナリオ・毒性の種類の違い・データ信頼性の6項目を各々10段階評価で行うため、UFは最大10⁶となる。ヒト健康リスク管理上、影響の算定には、このUFをいかに低くできるかが重要課題であり、観察された有害影響の発現メカニズムがヒトと共通であることが一定の確度をもっていえるかどうか検証の上、慎重に行うべきとされている。このうち、種間差の問題が、予測が難しく、最も解決困難な問題である。過去の事例では、ダイオキシンのクロルアクネ、サリドマイドの奇形などで知られている。以下、その例をダイオキシン及びサリドマイドについて示す。

ダイオキシンの例：非発がん性の毒性については、ヒトにおいて最も特徴的な影響がクロルアクネの発症である。実験動物では、サルにおいてのみ同様な症状が確認できている。妊娠母体への曝露による胎仔の死亡率のNOEL（最大無毒性量）及びLOEL（最小毒性量）でみると、サルで22及び111 ng/kg/day、ラットで30及び500 ng/kg/dayとなっておりLOELで約5倍の差がある。マウスにいたっては、500 ng/kg/dayでも胎仔の死亡率の有意な増加は観察されていない。一方、視点を変えて、各ヒト及び動物種での母親（獣）への曝露による胎児（胎仔）及び子どもへの最小毒性量で比較してみると、感受性が最も高かったヒトと最も低かったマウスで30倍以上の開きがあった（表3）。

表3 TCDDの最小毒性量の種差

種	最小毒性量における影響	母親（獣）における曝露量	文献	比較
ヒト	神経発達が遅延	バックグランドレベル <15 ng/kg	Duch studies; Huisman et al., 1995	1
サル	対象学習の遅延	19 ng/kg	Schantz and Bowman, 1989	1
ラット	開眼促進	50 ng/kg	Gray et al., 1997	3
マウス	水腎症	500 ng/kg	Silkworth et al., 1989	33

サリドマイドの例：サリドマイドが、ヒトに対して特徴的な四肢欠損の催奇形性を示すことは広く知られている。大きな種差の違いが予測できなかったため大きな惨事が起こった。この催奇形性のメカニズムは未だ明らかではない。その最大の理由は、マウスやラットに対しては、ほとんど毒性を示さないため、メカニズム研究が進んでいないことにある。Wistarラットに50mg/kg投与した場合に、胎仔の成長抑制が見られることから、ラットのNOELは25mg/kgとされている。マウスA系統では、31mg/kgである。ウサギはサリドマイドに対して感受性のある実験動物であるが、実験結果からの推定NOELは12mg/kgとされている。一方、サルにおけるNOELは0.625mg/kg未満とされ、サリドマイド被害者の処方量の1-40 mg/kg/dayより低い。サルと他の動物を比較してもその差は、10倍以上である（表4）。

表4 サリドマイドの推定NOELの種間差

	推定NOEL(m/k/d)	証拠	サルとの比較
マウス	31	31mg/kg/dayで低頻度の催奇形性	50
ラット	25	50mg/kg/dayで最小の発育遅延	42
ウサギ	12	12mg/kg/dayで最小の骨格の異形	20
サル	<0.625	0.625mg/kg/dayで重篤かつ典型的な催奇形性	1

出典: Newman, et al., 1993

ヒト ES 細胞使用の最終的な目的

未分化な時期における環境化学物質の曝露がその後の発達に及ぼす影響の検出系を開発し、胎生プログラミングに影響を及ぼす環境化学物質を迅速に多数検出することができれば、これらの環境化学物質に関する影響データを整備し、感受性の高い時期と考えられる小児や妊婦などに対して、ヒトの健康リスクを判定する際の資料となる評価システムを構築することが可能となる。このことが、環境化学物質による胎児期や幼少期の曝露が関与する疾患の予防法の開発や、食事を含めた生活環境の改善の具体的な施策につながる。

将来展望

本研究によって、胎生プログラミングへの影響の検出系が確立できれば、迅速に多数の化学物質の解析が可能となり、懸念されているヒト健康リスク、特に脆弱な周産期の母親や子どもへのリスク管理上、有用な情報がデータベースとして蓄積することが可能となる。その結果、将来的には、これを元にして危険性のある化学物質を含有している食物摂取の制限や、排出促進のための薬剤の開発など生活環境の改善に対する具体的な提言につながる。そのための、予防に役立つシステムの構築が可能となると考えられる。

「化学物質の健康影響予測システム」

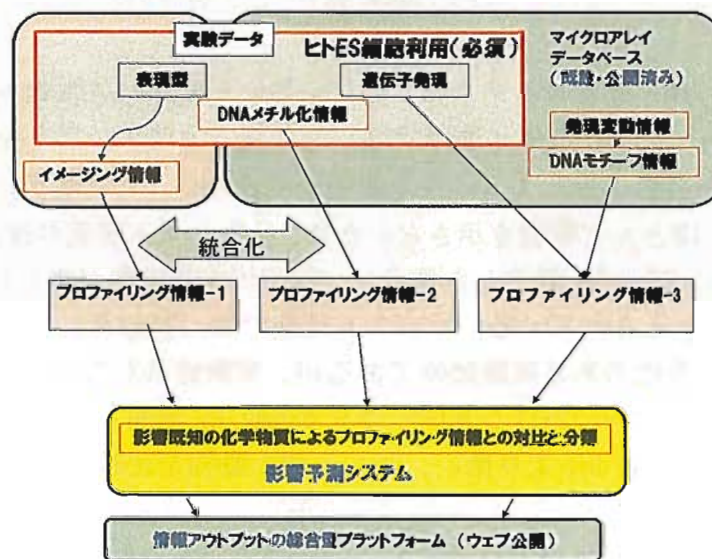


図7. 化学物質の健康影響予測システム

化学物質の健康影響予測システムは、実験データからなる2種のデータベース（遺伝子発現と細胞表現型）と3種のアプローチによって解析された3種類の2次情報（プロファイリング情報1-3）、さらに3種のプロファイリング情報を統合的に解析する影響予測システム部分から構成される。影響既知の毒性情報及びプロファイリング情報との対比により影響の類型化を行い、未知物質の分類を行うことによって予測する。

7) 使用の方法及び期間

使用の方法

前項で記載したように、本研究では、発達段階にある胎生期曝露とその晩発影響を、ヒト ES 細胞の分化への影響としての観点から実験手法を構築するとともに、得られる遺伝子発現および細胞表現型の情報を統合し解析することで、胎生プログラミングへの影響を解析する新たな検出法を開発するものである (図 8 参照)。従って、指針第 4 5 条で定める禁止事項について (すなわち、ヒト ES 細胞を使用して作成した胚のヒト又は動物の体内への移植その他の方法によりヒト ES 細胞から個体を作成すること、ヒト胚へのヒト ES 細胞を導入すること、ヒト胎児へヒト ES 細胞を導入すること、ヒト ES 細胞から生殖細胞を作成すること) は、行わない。

ヒト ES 細胞に、分化誘導剤を曝露し、神経系及び血管内皮系細胞への分化を誘導する。各標的細胞の分化マーカーを利用して、マルチチャンネル細胞画像解析装置により各分化細胞を認識させ、同時に各細胞の形態変化指標を解析する。それとともに、mRNA 発現、DNA メチル化を測定する。

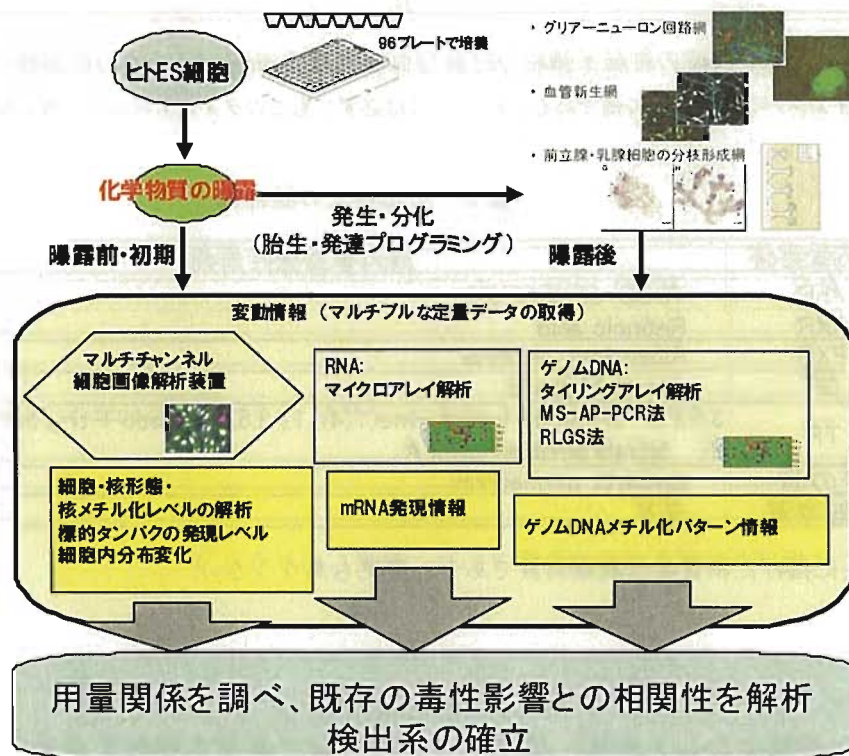


図 8. 研究方法の全体説明図

具体的には、マウス ES 細胞の時の培養プロトコールを基本に、ヒト ES 細胞を 37℃及び 5%CO₂ の環境条件下で、目的に適合した培養液及び基底膜でコートした 6-96 穴プレート上で培養し、培養初期に分化誘導剤を添加し、適切な期間培養して細胞集塊 (EB) を形成させる。その後、血管内皮及び神経系への分化に適したプレート上に再播種し血管内

皮及び神経系に分化させる。(図9参照) この分化プロトコールにおいて、分化誘導剤曝露後、もしくは、分化誘導剤の無存在下に各被験物質を添加し、一定時間曝露させる。その後、EBの形成時及び分化細胞において十分に分化マーカーが発現している時期の複数ポイントで細胞を採取し、RNA及びDNAを抽出する。同時に残りの細胞は固定液で固定し、細胞の形態計測に使用する。本研究計画に使用する化学物質は、Grandjean P (Lancet 2006) に示した神経毒性既存物質および高懸念物質から10化合物程度選定し、表5に示した各核内受容体作用剤との比較を行う(表5)。

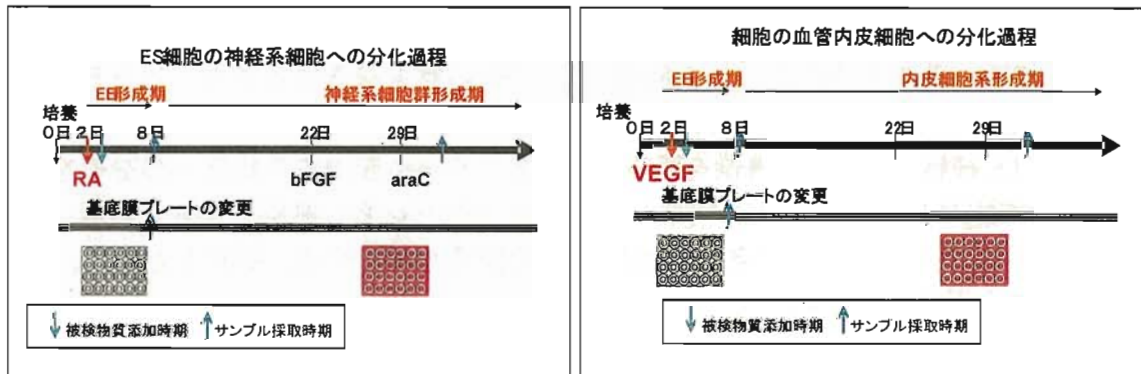


図9. ES細胞の神経系細胞(左)及び血管内皮系細胞(右)への分化実験の概略図

(注: タイムスパンはマウスの例である。ヒトESでは必ずしもこのタイムスパンと一致しない可能性がある)

表5 被験物質の候補例

核内受容体	核内受容体作用剤
AhR	TCDD, omeprazole
RXR	Retinoic acid
PXR	Rifampicin, nicotine
GR	dexamethazone
TR	3,5,3',5'-tetraiodo-L-thyronine(T(4), 1), 3,5,3'-triiodo-L-thyronine(T(3), 2), tetrabromobisphenol A
その他	carbaryl, permethrin
未知物質	未定

(ここに掲げた物質名は候補物質であり、変更もありうる。)

年次計画

Stage-1 (承認日から2年間) 胎生プログラミング異常を検出する系の確立

化学物質の影響をみるため、フィーダー細胞のない、無血清培地での培養条件、分化誘導剤及び被験物質の添加条件などの各種実験条件の確立を行う。各分化段階に応じた分化の指標(抗体)を用いて蛍光免疫化学的に細胞を標識し、分化度を確認する。同時に解析のための材料(RNA, DNAの抽出、細胞の固定)を準備する。

Stage-2 (3-4年目)

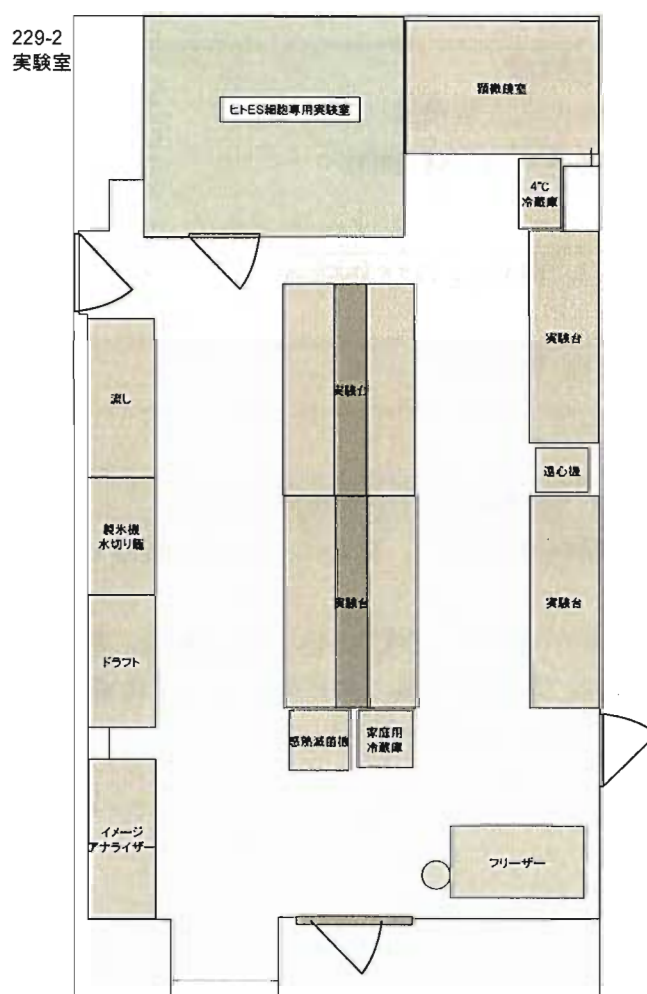
Stage-1で確立したアッセイ系に核内受容体の代表的作用剤(表5参照)を中心に種々の被験物質を曝露し、影響を調べる。

<p>Stage-3 (5年目)</p> <p>引き続き、種々の被験物質の影響を評価する。</p> <p>使用期間：関係機関の所定の手続きが終了した後に、使用が可能となった日から5年間とする。</p>

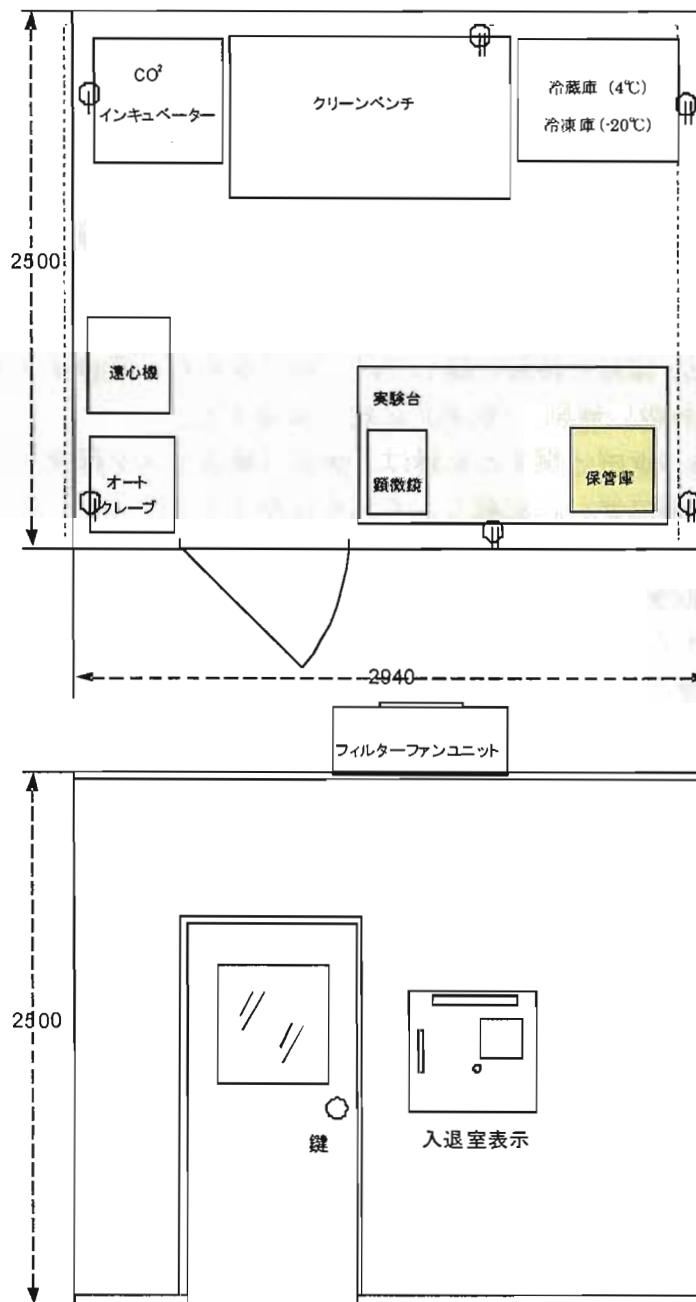
8) 使用に供されるヒト ES 細胞の入手先及びヒト ES 細胞の名称	
入手先の名称	京都大学再生医科学研究所
入手先の機関 長 氏 名	中辻憲夫
入手先の所在 地	〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53 電話番号 075-751-3802
ヒト ES 細胞 の 名 称	KhES-1, KhES-2 及び KhES-3
樹 立 日 時	平成 15 年 11 月
そ の 他	
9) 使用完了後のヒト ES 細胞及び分化細胞の取扱い	
<p>供与される予定の細胞株 KhES-1, KhES-2 及び KhES-3 は研究計画の終了後、廃棄するものとする。</p> <p>廃棄は、オートクレーブにて 121℃で 15 分間滅菌後、廃棄する。</p> <p>ただし、分化細胞は、実験終了後、独立行政法人国立環境研究所ヒト ES 細胞使用研究倫理規程 13 条にもとづいて保管する。</p>	

10) 使用機関の基準に関する説明

施設：本使用計画に伴うヒト ES 細胞実験は、独立行政法人国立環境研究所内の研究本館 I 号棟 2 階の 229-2 号実験室内のヒト ES 細胞専用実験室において行う。実験室の間取りは下記の図の通りである。他の動物細胞とは取り扱う場所を別にする。ヒト ES 細胞を保管する際には、ヒト ES 細胞であることを見やすい場所に明示する。また、ヒト ES 細胞の保管は、使用計画においてヒト ES 細胞の研究を行うとされている者が保管庫に施錠して管理する（次頁のヒト ES 細胞専用実験室内の間取り及び入口の構造図を参照）。ヒト ES 細胞専用実験室の出入りは、別に定めた機関内の環境リスク研究センターヒト ES 細胞使用に関する取扱い規則に従い、入退出の記録を行い、出入り口には施錠を行う。施錠の管理は、使用責任者が行う。



ヒト ES 細胞専用実験室の位置



ヒト ES 細胞専用実験室内の間取り及び入口の構造図

人員：本使用計画に伴うヒト ES 細胞実験は、上記の記載どおり使用責任者 1 名、使用分担者 2 名、研究者 1 名で実施する。本使用計画を実施するにあたり、ヒト ES 細胞の使用に関する上記資料の提出、ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会資料の提出、また文部科学省による調査の受け入れに関しては、独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター（電話 029-850-2553）をその窓口とする。

教育研修計画：

ヒト ES 細胞を取り扱うための技術的能力の向上及び倫理的な配慮の徹底のために別添「独立行政法人国立環境研究所ヒト ES 細胞使用技術及び倫理教育研究計画」を策定している。

遵守すべき技術的及び倫理的な事項に関する規則：

- ・ ヒト ES 細胞の使用に際して遵守すべき技術的及び倫理的な事項に関する規則は、別添「独立行政法人国立環境研究所ヒト ES 細胞使用研究倫理規程」に相当するものであり、その規程には、指針に基づく、禁止事項、機関の長の役割、関係者の業務などを記載している。
- ・ 実際のヒト ES 細胞の使用に関しては、別に定めた「環境リスク研究センターヒト ES 細胞使用取扱い規則」（別添）に従い実施する。
- ・ ヒト ES 細胞の使用に関する記録は、別添「環境リスク研究センターヒト ES 細胞使用・保管記録用紙」に記載し、これを保存する。

倫理審査委員会の設置：

別添「独立行政法人国立環境研究所ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会運営要領」にしたがった委員会を設置。

11) 使用に供されるヒト ES 細胞が国内から提供される場合における当該ヒト ES 細胞の樹立及びに分配の条件が文科省指針に適合することの説明

該当なし

12) 使用に供されるヒト ES 細胞が海外から提供される場合における当該ヒト ES 細胞の樹立及びにその譲渡の条件に関する説明

該当なし

13) 作成した分化細胞の分配が予定される場合における当該分配細胞及びその分配に関する説明

分化細胞の分配は行わない。

14) その他必要な事項

特に記載なし

参考資料1

別添1 使用責任者、使用分担者及び研究者の氏名、所属、略歴、研究業績及び、使用計画において果たす役割、

⑥ES細胞取り扱い実績、⑦ヒトES細胞に関する倫理的教育・研修などの履歴

使用責任者の①氏名、②所属、③略歴、④研究業績及び、⑤使用計画において果たす役割、⑥ES細胞取り扱い実績、⑦ヒトES細胞に関する倫理的教育・研修などの履歴	
①氏名	曾根秀子
②所属	独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター
③略歴	<p>1983年3月 東邦大学薬学部大学院修士課程修了(薬理学)</p> <p>1983年4月～1989年4月 株式会社ツムラ 薬理研究所 研究員</p> <p>1989年5月～1992年4月 国立がんセンター研究所 発がん研究部 研修生</p> <p>1992年5月～1994年3月 株式会社ツムラ 薬理研究所 副主任研究員</p> <p>1993年11月 東邦大学 博士取得(薬学)</p> <p>1994年4月～1995年3月 国立環境研究所 環境健康部 科学技術特別研究員</p> <p>1995年4月～2001年3月 国立環境研究所 地域環境研究グループ 主任研究員</p> <p>2001年4月～2002年3月 独立行政法人国立環境研究所 環境ホルモン・ダイオキシン研究プロジェクト主任研究員</p> <p>2002年4月～2005年3月 米国国立環境健康科学研究所(NIEHS) 環境毒性学プログラム 客員研究員</p> <p>2005年4月～2006年3月 独立行政法人国立環境研究所 環境ホルモン・ダイオキシン研究プロジェクト主任研究員</p> <p>2006年4月～現在 独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター健康リスク評価室 主任研究員</p>
④研究業績	<ol style="list-style-type: none"> 1. Takeyama M, <u>Sone H</u>, Tohyama C: (2001) ChangES in exprESSion of NMDA receptor subunit mRNA by perinatal exposure to dioxin. <i>Neuroreport</i>. 12(18):4009-12. 2. Ohsako S, Miyabara Y, Nishimura N, Kurosawa S, Sakaue M, Ishimura R, Sato M., Takeda K, Aoki Y, <u>Sone H</u>, Tohyama C, and Yonemoto J: (2001) Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-<i>p</i>-dioxin (TCDD) supprESSed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5α-reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. <i>Toxicol. Sci.</i>, 60: 132-143. 3. Ikeda M., Inukai N, Mitsui T, <u>Sone H</u>, Yonemoto J, Tohyama C, and Tomita T: (2001) ChangES in fetal brain aromatase activity following in utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-<i>p</i>-dioxin exposure in rats. <i>Environmental Toxicology and Pharmacology, Environ Toxicol Pharm</i> 11:1-7. 4. Jia G., Tohyama C, <u>Sone H</u>: (2002) DNA damage triggers imbalance of proliferation and apoptosis during development of preneoplastic foci in the liver of Long-Evans Cinnamon rats. <i>Int J Oncol</i>, 21: 755-761. 5. Kurachi M, Hashimoto S, Obata A, Nagai S, Nagahata T, Inadera H, <u>Sone H</u>, Tohyama C, Kaneko S, Kobayashi K, Matsushima K: (2002) Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-<i>p</i>-dioxin-rESponsive genES in mouse liver by serial analysis of gene exprESSion. <i>Biochem Biophys RES Commun</i> 292 :368-377. 6. Nohara K, Fujimaki H, Tsukumo S, Inouye K, <u>Sone H</u>, Tohyama C: (2002) Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-<i>p</i>-dioxin (TCDD) on T cell-derived cytokine production in ovalbumin (OVA)-immunized C57Bl/6 mice. <i>Toxicology</i>, 172:49-58. 7. Takeyama M, <u>Sone H</u>, Miyabara Y, Tohyama C: (2003) Perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-<i>p</i>-dioxin alters activity-dependent exprESSion of BDNF mRNA in the neocortex and male rat sexual behavior in adulthood. <i>Neurotoxicology</i> 24:207-217. 8. Sato H, Suzuki KT, <u>Sone H</u>, Yamano Y, Kagawa J, Aoki Y: (2003) DNA-adduct formation in lungs, nasal mucosa, and livers of rats exposed to urban roadside air in Kawasaki City, Japan. <i>Environ RES</i> 93(1):36-44. 9. Ishizuka M, Yonemoto J, Zaha H, Tohyama C and <u>Sone H</u>: (2003) Perinatal exposure to low dosES of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-<i>p</i>-dioxin (TCDD) alters sex-dependent exprESSion of hepatic CYP2C11. <i>J Biochem Mol Toxicol</i> 17 (5): 278-285.

10. Kusumegi T, Tanaka J, Kawano M, Yonemoto J, Tohyama C, Sone H: (2004) BMP7/ActRIIB regulatES EStrogen-dependent apoptosis: new biomarkers for environmental EStrogens. *J Biochem Mol Toxicol.* 18(1):1-11.
11. Jia G, Sone H, Nishimura N, Satoh M and Tohyama C: (2004) Metallothionein (I/II) supprESsES genotoxicity caused by dimethylarsinic acid. *Int J Oncol*, 25(2):325-333.
12. Toyoshiba H, Yamanaka T, Sone H, Parham FM, Walker NJ, Martinez J, Portier CJ: (2004) Gene interaction network suggESts dioxin inducES a significant linkage between aryl hydrocarbon receptor and retinoic acid receptor beta. *Environ Health Perspect.* 112 (12):1217-24.
13. Yamanaka T, Toyoshiba H, Sone H, Parham FM, Portier CJ: (2004) The TAO-Gen algorithm for identifying gene interaction networks with application to SOS repair in E. coli. *Environ Health Perspect.* 2004 Nov;112(16):1614-21.
14. Terasaka S, Aita Y, Inoue A, Hayashi S, Nishigaki M, Aoyagi K, Sasaki H, Wada-Kiyama Y, Sakuma Y, Akaba S, Tanaka J, Sone H, Yonemoto J, Tanji M, Kiyama R: (2004) Using a customized DNA microarray for exprESSion profiling of the EStrogen-rESponsive genES to evaluate EStrogen activity among natural EStrogens and industrial chemicals. *Environ Health Perspect*, 112(7):773-81.
15. Ikeda M, Mitsui T, Setani K, Tamura M, Kakeyama M, Sone H, Tohyama C, Tomita T: (2005) In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats disrupts brain sexual differentiation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 205 (1):98-105.
16. Sarkar P, Shiizaki K, Yonemoto J, Sone H: (2006) Activation of telomerase in BeWo cells by EStrogen and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in co-operation with c-Myc. *Int J Oncol.* 28 (1):43-51.
17. Jia G, Takahashi R, Zhang Z, Tsuji Y, Sone H: (2006) Aldo-keto reductase 1 family B7 is the gene induced in rESponse to oxidativESTrESs in the livers of Long-Evans Cinnamon rats. *Int J Oncol.* 29 (4):829-38.
18. Toyoshiba H, Sone H, Yamanaka T, Parham FM, Irwin RD, Boorman GA, Portier CJ: (2006) Gene interaction network analysis suggESts differencES between high and low dosES of acetaminophen. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 Sep 15;215 (3):306-16.
19. Portier CJ, Toyoshiba H, Sone H, Parham F, Irwin RD, Boorman GA. (2006) Comparative analysis of gene networks at multiple dosES and time points in livers of rats exposed to acetaminophen. *ALTEX*.;23 Suppl:380-4.
20. Tanaka J, Yonemoto J, Zaha H, Kiyama R and Sone H: (2007) EStrogen-rESponsive genES newly found to be modified by TCDD exposure in human cell linES and mousESystems. *Mol Cell Endocrinol.* Apr 27; [Epub ahead of print].

関連学術集会

1. 第 55 回学内 COE「細胞社会学の拠点形成」セミナー：環境化学物質の健康リスク評価のためのヒト ES 細胞を用いたバイオアッセイ系の開発に関する研究 岡山大学 平成 19 年 3 月 29 日
2. Hideko Sone: EStablishment of a System using Mouse Embryonic Stem Cells to Evaluate for the Effects of Chemicals on Development. 6th World CongrESs on Alternative & Animal Use in the LifESciencES. August, 2007 (Tokyo).
3. Satoshi Imanishi, Junzo Yonemoto, Hideko Sone. Evaluation of Vascular Toxicity of Permethrin in Human Endothelial Cell and Mouse ES Cell. 47th Annual Meeting of thESociety of Toxicology, March 16-20, 2008, Seattle, Washington (accepted)
4. 今西 哲、米元純三、白石寛明、曾根秀子. 殺虫剤 Permethrin がヒト脳毛細血管内皮細胞に及ぼす影響 第 10 回環境ホルモン学会研究発表会 平成 19 年 12 月 10 日、11 日 大宮 埼玉 2007 年
5. 永野麗子、小池上繁、今西哲、座波ひろこ、米元純三、曾根秀子. レチノイン酸によるマウス ES 細胞の分化・増殖への影響に関する研究 第 10 回環境ホルモン学会研究発表会 12 月 10 日、11 日 大宮 埼玉 2007

⑤本研究に果たす役割

サブテーマ1 細胞工学を用いた胎生プログラミング異常を検出するモデル細胞系の確立と細胞形態変化の解析
 サブテーマ2 細胞表現型解析 (イメージング・遺伝子発現・メチル化ステータス) とマルチプロファイリングのためのデータ取得)、サブテーマ3 数理工学を用いた表現型情報からのマルチプロファイリングのすべての行程に関して、統括し指揮を行う。また、研究員が培養や曝露実験が行えない場合に、交代としてそれらの実験を行う。

⑥ES 細胞取り扱い実績

実績期間：平成 17 年 12 月より平成 20 年 5 月現在、2 年 5 ヶ月

培養実績内容：曾根は、平成 17 年 12 月からマウス ES 細胞株 (E14tg2a) を用いて、ES 細胞の継代、ES から EB への分化実験と化学物質の暴露実験を行った。平成 18 年 3 月には B6G2 株 (RIKENCELL BANK) を用いて、神経系への分化に対する外因性物質による ES 細胞分化への影響評価に関する実験を行った。外因性物質の培地への添加濃度による神経系細胞への分化程度が異なるという成果を得た。さらに、平成 19 年 5 月より無フィーダー細胞、無血清条件で ES 細胞を維持の確立に務めるとともに、血管内皮細胞系への分化過程への影響についても評価系を確立し、血管形成抑制作用を持つ化学物質を見出した。

⑦ヒト ES 細胞に関する倫理的教育・研修などの履歴

平成 19 年 3 月 2 日国立環境研究所においてヒト ES 細胞研究講演会に参加

平成 19 年 3 月 12 日京都大学においてヒト ES 細胞研究交流会に参加

平成 19 年 3 月 29 日岡山大学においてヒト ES 細胞研究の倫理に関する講演会に参加

本研究計画承認後、京都大学再生医学研究所において、ヒト ES 細胞技術研修会に参加予定

<p>使用分担者の①氏名、②所属、③略歴、④研究業績及び、⑤使用計画において果たす役割、⑥ES細胞取り扱い実績、⑦ヒトES細胞に関する倫理的教育・研修などの履歴</p>	
①氏名	今西 哲
②所属	独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター
③略歴	<p>平成19年3月 京都大学大学院農学研究科博士課程修了 (平成16年4月～平成19年3月 日本学術振興会特別研究員) 平成19年4月～現在 国立環境研究所 NIES ポスドクフェロー</p>
④研究業績	<p>1. <u>Satoshi Imanishi</u>, Noboru Manabe, Takako Tanaka, Reika Okamoto, Maki Morita, Miki Sugimoto, Hajime Miyamoto. mRNA ExprESSion of GPRC5B/Raig2, a novel orphan receptor, exprESs in murine placentae. Journal of Reproduction and Development, Vol. 48, No. 6. pp 627-632, 2002.</p> <p>2. Miki Sugimoto, Noboru Manabe, Maki Morita, Takako Tanaka, Reika Okamoto, <u>Satoshi Imanishi</u> Hajime Miyamoto. NMR microscopic observation of mouse embryo malformations induced by maternal administration of retinoic acid. The Journal of Veterinary Medical Science, 64 (5): 427-433, 2002.</p> <p>3. <u>Satoshi Imanishi</u>, Noboru Manabe, Mineko Iwahori, Hanako Nishizawa, Maki Morita, Miki Sugimoto, Hajime Miyamoto. Effects of bisphenol A on mRNA exprESSion of nuclear receptors in murine placentae assESSed by DNA microarray. Journal of Reproduction and Development, Vol. 49, No. 4. pp 329-336, 2003.</p> <p>4. Hanako Nishizawa, Noboru Manabe, Maki Morita, Miki Sugimoto, <u>Satoshi Imanishi</u>, Hajime Miyamoto. Effects of in utero exposure to bisphenol A on exprESSion of RARalpha and RXRalpha mRNAs in murine embryos. Journal of Reproduction and Development. Vol. 49, No. 6. pp 539-45, 2003.</p> <p>5. Hanako Nishizawa, <u>Satoshi Imanishi</u>, Noboru Manabe. Effects of exposure in utero to bisphenol a on the exprESSion of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymES in murine embryos. Journal of Reproduction and Development, Vol. 51, No. 5. pp 593-605, 2005.</p> <p>6. Hanako Nishizawa, Maki Morita, Miki Sugimoto, <u>Satoshi Imanishi</u>, Noboru Manabe. Effects of in utero exposure to bisphenol A on mRNA exprESSion of arylhydrocarbon and retinoid receptors in murine embryos. Journal of Reproduction and Development. Vol. 51, No. 3. pp 315-24, 2005.</p> <p>関連学術集会</p> <p>1. <u>Satoshi Imanishi</u>, Junzo Yonemoto, Hideko Sone. Evaluation of Vascular Toxicity of Permethrin in Human Endothelial Cell and Mouse ES Cell. 47th Annual Meeting of thESociety of Toxicology, March 16-20, 2008, Seattle, Washington (accepted)</p> <p>2. <u>今西 哲</u>, 米元純三、白石寛明、曾根秀子. 殺虫剤 Permethrin がヒト脳毛細血管内皮細胞に及ぼす影響 第10回環境ホルモン学会研究発表会 12月10日、11日 大宮 埼玉 2007</p> <p>3. 永野麗子、小池上繁、<u>今西哲</u>、座波ひろこ、米元純三、曾根秀子. レチノイン酸によるマウス ES 細胞の分化・増殖への影響に関する研究 第10回環境ホルモン学会研究発表会 12月10日、11日 大宮 埼玉 2007</p>
⑤本研究に果たす役割	<p>サブテーマ1「細胞工学を用いた胎生プログラミング異常を検出するモデル細胞系の確立と細胞形態変化の解析」及びサブテーマ2「細胞表現型解析(イメージング・遺伝子発現・メチル化ステータス)とマルチプロファイリングのためのデータ取得」において、ヒトES細胞の培養、細胞工学的加工、分化誘導、被験物質への曝露実験および、表現型の解析を担当する。</p>

⑥ES 細胞取り扱い実績

実績期間：平成 19 年 5 月より平成 20 年 5 月現在、12 ヶ月

実績内容；マウス ES 細胞を培養し、EB 形成から神経系及び血管内皮系への分化誘導の培養を行い、形態観察及びイメージング解析を行った。

⑦ヒト ES 細胞に関する倫理的教育・研修などの履歴

平成 19 年 3 月 12 日京都大学においてヒト ES 細胞研究交流会に参加

平成 19 年 5 月 24 日ヒト ES 細胞指針改定に関する講習会に参加

本研究計画承認後、京都大学再生医学研究所において、ヒト ES 細胞技術研修に参加予定

使用分担者の①氏名、②所属、③略歴、④研究業績及び、⑤使用計画において果たす役割、⑥ES細胞取り扱い実績、⑦ヒトES細胞に関する倫理的教育・研修などの履歴

①氏名 永野麗子

②所属 独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター

③略歴

平成 6年 3月 日本大学大学院 農学系研究科修士課程 修了
 平成 6年 4月 東京大学大学院 農学生命科学研究科博士課程 入学
 平成 10年 4月 日本学術振興会 特別研究員 (DC2)
 平成 11年 3月 東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程 (獣医学博士) 修了
 平成 11年 4月 日本学術振興会 特別研究員 (PD) (農業生物資源研究所)
 平成 13年 1月 科学技術振興事業団 科学技術特別研究員 (農業生物資源研究所)
 平成 16年 1月 独立行政法人 物質・材料研究機構 生体材料研究センター
 医工連携チーム 特別研究員
 平成 18年 4月 (株)インテック(派遣先: グラクソスミスクライン筑波研究所)
 平成 18年 10月 独立行政法人 国立環境研究所 環境健康研究領域 NIES ポスドクフェロー
 平成 19年 10月 独立行政法人 国立環境研究所 環境リスク研究センター NIES ポスドクフェロー

④研究業績

1. Nagano, R., Kanai, Y., Kurohmaru, M., Hayashi, Y. and Nishida, T. ChangES in lectin binding patterns of chick primordial germ cells and Sertoli cell during sexual differentiation. *J. Vet. Med. Sci.* 57(4): 623-627, 1995.
2. Nagano, R., Kanai, Y., Kurohmaru, M., Hayashi, Y. and Nishida, T. Distribution of dESmin and fibronectin in chick embryo gonad during tESicular cord formation. *J. Vet. Med. Sci.* 59. :581-585, 1997.
3. Ohsako, S., Nagano, R., Sugimoto, Y. and Goto, K. Comparison of the nuclear DNA stability against low and high temperature treatments between spermatozoa and somatic cells. *J. Vet. Med. Sci.* 59(11):1085-1088, 1997.
4. Ohsako, S., Ikoma, E., Nakanishi, Y., Nagano, R., Matsumoto, M. and Nishinakagwa, H. Isolation of a miniaturESwinESeminal plasma haemagglutinin from thESperm surface. *J. Reprod. Dev.* 43 (1):311-319, 1997
5. Ohasako, S., Ikoma, E., Nakanishi, Y., Nagano, R., Matsumoto, M. and Nishinakagawa, H. A seminal plasma haemagglutinin isolation from thESurface of the miniturESwinESperm is derived from seminal vESicle. *J. Reprod. Dev.* 44 (1):101-105, 1998.
6. Toyoshima, Y., Ohsako, S., Nagano, R., Matsumoto, M., Hidaka, S. and Nishinakagawa, H. Histological changES in mouse nipple tissue during the reproductivecycle. *J. Vet. Med. Sci.* 60. (4) :405-411. 1998.
7. Nagano, R., Xiuhua, S., Kurohmaru, M., and Hayashi, Y. ChangES in lectin binding patterns of mouse male germ cells (gonocytES) during prESpermatogenESis. *J. Vet. Med. Sci.* 61 (5) :465-470. 1999.
8. Matsui, Y., Nagano, R., and Obinata, M. Apoptosis of fetal tESicular cells is regulated by both p53-dependent and independent mechanisms. *Mol. Reprod. Dev.* 55:399-405, 2000
9. 斉田要、米谷尚子、橋本将男、増田洋美、Javier Adua, 永野一大迫 麗子, 季 充植、富塚 登、岡 修一、三井洋司、石田真理雄、打出毅 血管作動性腸管収縮ペプチド(VIC)/エンドセリン-2 の前駆体遺伝子の構造解析と胎児における発現 *消化管ホルモン (XVIII)* 6月、2000
10. Nagano, R., Tabata, S., Nakanishi, Y., Ohsako, S., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytES) during prESpermatogenESis. *Anat. Rec.* 258:210-220, 2000
11. Ogura, A. Inoue, K., Ogonuki, N., Noguchi, A., Takano, K., Nagano, R., Suzuki, O., Jiyoung, L., Ishino, F., Matsuda, J. Production of male cloned mice from frESh, cultured, and cryoprEServed immaturESertoli cells,

Biol. Reprod. 62:1579-1584,2000

12. Fukuzawa H.N., Nagano R., Baba T., Tohyama C., and Ohsako S. Coplanar polychlorinated biphenyl (co-PCB) affects steroidogenic enzyme mRNA expression in the neonatal mouse testis in vitro. *Organohalogen Compounds* 53, 368-371, 2001
13. Fukuzawa H.N., Nagano R., Ishimura R., Sakaue M., Tohyama C., and Ohsako S. Effects of co-planar polychlorinated biphenyl (co-PCB) on cultured neonatal mouse testis. *Toxicol in Vitro* 2003
14. 細川剛、永野麗子、持立克身. 再構成基底膜構造体 sBM～精緻な人工組織構築を可能にする培養基質～遺伝子 医学MOOK 別冊「進み続ける細胞移植治療の実際～再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解」 「第3章 移植細胞のための周辺科学・技術」～ 2008年 4月 発刊
15. 永野麗子、細川剛、古山昭子、持立克身. 基底膜構造体を培養基質に用いた人工組織の構築 *Japanese Journal of Transplantation* 43 (1), 10-16, 2008

関連学術集会

1. 永野麗子、小池上繁、今西哲、座波ひろこ、米元純三、曾根秀子. レチノイン酸によるマウス ES 細胞の分化・増殖への影響に関する研究 第10回環境ホルモン学会研究発表会 12月10日、11日 大宮 埼玉 2007

⑤本研究に果たす役割

サブテーマ1「細胞工学を用いた胎生プログラミング異常を検出するモデル細胞系の確立と細胞形態変化の解析」及びサブテーマ2「細胞表現型解析（イメージング・遺伝子発現・メチル化ステータス）とマルチプロファイリングのためのデータ取得」において、ヒト ES 細胞の培養、細胞工学的加工、分化誘導、被験物質への曝露実験および、表現型の解析を担当する。

⑥ES 細胞取り扱い実績

実績期間：平成 19 年 10 月より平成 20 年 5 月現在、8 ヶ月

実績内容：マウス ES 細胞を培養し、EB 形成から神経系の分化誘導後、発現型マイクロアレイのための RNA の回収、形態観察及びイメージング解析を行った。

⑦ヒト ES 細胞に関する倫理的教育・研修などの履歴

平成 19 年 3 月 2 日独立行政法人国立環境研究所において「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針について」の説明会を受講

平成 19 年 3 月 12 日京都大学においてヒト ES 細胞研究交流会に参加

本研究計画承認後、京都大学再生医学研究所において、ヒト ES 細胞技術研修会に参加予定

使用に関わる研究者の①氏名、②所属、③略歴、④研究業績及び⑤使用計画において果たす役割、⑥ES細胞取り扱い実績、⑦ヒトES細胞に関する倫理的教育・研修などの履歴

①氏名 座波ひろ子

②所属 独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター

③略歴

平成13年3月 広島大学大学院生物圏科学研究科修士課程修了
 平成13年4月～平成15年12月 科学技術振興事業団CREST技術員
 平成16年1月～現在 国立環境研究所NIESアシスタントフェロー

④研究業績

1. M. Ishizuka, J. Yonemoto, H. Zaha, C. Tohyama, and H. Sone, Perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11, J Biochem Mol Toxicol 17 (2003) 278-285.
2. Zaha Hiroko, Sone Hideko, Yonemoto Junzo, Hisano Setsuji, Maeda Shuichiro, Tohyama Chiharu. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the expression and localization of secreted frizzled-related protein 2 (sfrp-2) in the mouse fetal brain. 環境ホルモン学会（広島）2002
3. Zaha Hiroko, Sone Hideko, Yonemoto Junzo, Hisano Setsuji, Maeda Shuichiro, Tohyama Chiharu. Increased level and asymmetrical localization of secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) mRNA in the murine fetal brain perinatally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Society of Toxicology (Salt Lake City) 2003
4. 永野麗子、小池上繁、今西哲、座波ひろ子、米元純三、曾根秀子. レチノイン酸によるマウスES細胞の分化・増殖への影響に関する研究 第10回環境ホルモン学会研究発表会 12月10日、11日 大宮 埼玉 2007

⑤本研究に果たす役割

サブテーマ1「細胞工学を用いた胎生プログラミング異常を検出するモデル細胞系の確立と細胞形態変化の解析」及びサブテーマ2「細胞表現型解析（イメージング・遺伝子発現・メチル化ステータス）とマルチプロファイリングのためのデータ取得」において、ヒトES細胞の培養、細胞工学的加工、分化誘導、被験物質への曝露実験および、表現型の解析を担当する。

⑥ES細胞取り扱い実績

実績期間：平成18年4月より平成19年10月現在、1年6ヶ月

実績内容：マウスES細胞を培養し、EB形成から神経系の分化誘導の培養を行い、形態観察及びイメージング解析を行った。

⑦ヒトES細胞に関する倫理的教育・研修などの履歴

平成19年3月2日独立行政法人国立環境研究所においてヒトES細胞使用研究に関するセミナーを受講。

本研究計画承認後、国立環境研究所において、ヒトES細胞技術研修会に参加予定

独立行政法人国立環境研究所ヒトES細胞使用技術及び倫理教育研究計画

研究機関 独立行政法人 国立環境研究所
研究機関の長 大塚柳太郎

1. マウスES細胞の取扱い実績のみの使用分担者、研究者に対して行うヒトES細胞の取扱いに関する基本的な技術の習得のための実技研修

文部科学省の科学技術・学術審議会生命倫理・安全部会 特定胚及びヒトES細胞等研究専門委員会の承認後、使用機関（国立環境研究所）に所属する使用責任者及び使用分担者は、ヒトES細胞の取扱いに関する基本的な技術の習得、及び倫理的な認識を向上させるための教育研修の受講を、樹立機関である京都大学再生医学研究所附属幹細胞医学研究センター 霊長類胚性幹細胞研究領域の末盛博文准教授の下で実施する。研修修了者は、今後、ヒトES細胞使用予定であり未研修の使用分担者や研究者に対して、使用機関内に設置されているヒトES細胞専用実験室において、京都大学と同様の教育研修プログラムに基づいて講習を行い、終了後に受講確認の証明として国立環境研究所から修了証を発行する。

2. ヒトES細胞を巡る法律、社会的位置づけ、及び周辺環境の理解を深める勉強会の開催

- 2-1) ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針の内容の理解を深め、使用機関内における法令遵守（Compliance）の体制の確立と徹底化を行うための勉強会

ヒトES細胞の取り扱いを規則正しく守るために、使用責任者、使用分担者及び研究者を対象にヒトES細胞に関する法律の勉強会を年に1回程度実施する。

- 2-2) ヒトES細胞の医学・生物学的な基礎知識の向上を図るための勉強会

使用責任者、使用分担者及び研究者を対象に定期的を実施する。または、他研究機関で行われるヒトES細胞の研究集会に積極的に参加し、これを勉強会として代替する。

- 2-3) 医療関係者などの専門家による生命倫理（Bioethics）に関する講習会や専門書などの輪読会

使用責任者、使用分担者及び研究者を対象に年に1回程度実施する。

独立行政法人国立環境研究所ヒトES 細胞技術研修計画書

【目的】ヒトES細胞使用計画書の承認後に、京都大学再生医科学研究所において、ヒトES 細胞の取扱いに関する基本的な技術の習得のための実技研修を行い、培養技術を習得する。

【実習機関名】 京都大学再生医科学研究所

【責任者】 末盛博文（京都大学再生医科学研究所）

【実習指導者】 末盛博文

【対象者】 曾根秀子、永野 麗子、今西 哲（独立行政法人国立環境研究所）

【研修期間】 大臣確認後、熟練度に応じて適宜設定。

【使用細胞株】 ヒトES 細胞株：KhES-1（平成15年8月樹立）KhES-2、KhES-3（平成15年11月樹立）

【研修項目】

- ・ フィーダー細胞の作成、継代培養、凍結保存
- ・ ヒトES 細胞の培養、継代培養、細胞形態の観察、チェックポイントの確認
- ・ ヒトES 細胞の凍結保存

独立行政法人国立環境研究所ヒトES 細胞取扱い研修計画書

【目的】ヒトES細胞使用計画書の承認後に、京都大学再生医科学研究所において、ヒトES 細胞の取扱いに関する基本的な技術の習得を行った者が、研究者に対して、ヒトES細胞を取扱うための技術的能力の向上のために行う。

【実習機関名】独立行政法人国立環境研究所

【責任者】曾根秀子（独立行政法人国立環境研究所）

【実習指導者】永野麗子（独立行政法人国立環境研究所）

【習得確認者】永野麗子（独立行政法人国立環境研究所）

【対象者】座波ひろ子（独立行政法人国立環境研究所）

【研修期間】習得が完了するまで（2週間程度）。

【使用細胞株】ヒトES 細胞株：KhES-1（平成15年8月樹立）KhES-2、KhES-3（平成15年11月樹立）

【研修項目】

- ・ フィーダー細胞の作成、継代培養、凍結保存
- ・ ヒトES 細胞の培養、継代培養、細胞形態の観察、チェックポイントの確認
- ・ ヒトES 細胞の凍結保存

【研修項目の具体的な内容】

1)フィーダー細胞の作製(1日目～8日目まで)

1) フィーダー細胞の採取

1. 妊娠 12 日目雌マウスを頸椎脱臼で安楽死させる
2. 腹を上にして固定し全身を 70%EtOH で湿らす
3. 腹を切開して子宮を露出, 取り出して sterile PBS(-)に入れる
4. sterile PBS(-)で 3 回リンス
5. 子宮を切開して胎仔を取り出し, 新たな sterile PBS(-)に入れる
6. sterile PBS(-)で 3 回リンス
最後のリンスの時に, 頭部と肝臓を切断除去し, 新たな 10%FBS/DMEM に入れる
7. 針付注射器に少量の培地を吸って頭部切断面から体内臓器の吸引注入を繰り返す
8. 全ての個体の Embryo soup をひとつのチューブにまとめる
9. よくピペティングし, 再び同じ dish に播き直す
10. CO2incubator で培養を開始する。

2)フィーダー細胞の継代培養を行う(P0→P1)

1. confluent 近くなったら 3 倍希釈で継代。PBS(-)で軽く洗った後、0.125% trypsin-EDTA、37°C 3min 温めた後 dish を軽くたたきときれいに細胞が剥がれてくる(顕微鏡下で確認する)
2. 反応 stop 用の 10%FBS/DMEM を加え、50ml チューブにまとめる
3. 1000rpm 3min 遠心し、上清を取り除いた後、新しい 10%FBS/DMEM 320ml に加える

3)フィーダー細胞の継代培養を行う (P1→P2)

4)フィーダー細胞の継代培養 を行う(P2→P3)

5)フィーダー細胞の MMC 処理と凍結保存を行う

1. 10 μ g/ml MMC/10%FBS/DMEM を調整し 37°Cで温めておく
2. 培地を除き 10 μ g/ml MMC/10%FBS/DMEM を6ml ずつ入れ 37°Cで2時間の処理を行う
3. MMC の入った MEM を除き、通常の DMEM を入れ反応 STOP
4. Sterile PBS(-)で洗い、0.125% trypsin-EDTA を2ml入れ、細胞を剥がす
5. 等量の 10%FBS/DMEM を加え反応 STOP させ、細胞を全て回収する
6. 1000rpm 3min 遠心後、上清を取り除きセルバンカー100ml に全細胞を浮遊させる
7. 細胞数をカウントし、保存用バイアルに 1ml ずつ分注し-80°Cで保存

2)ヒトES細胞の培養、継代培養、細胞形態の観察、凍結保存(9日目から14日目まで)

1)凍結保存したフィーダー細胞を起こす

2)あらかじめ、必要な数の分だけ 60mm dish 上に 0.1%ゼラチンコート を 37°Cで 1~3時間行う。

3)凍結保存したフィーダー細胞を常法に基づいて溶解し、フィーダー用培地で 1.5×10^5 cells/10mm dish に播種する

4)24 時間培養を行う

5)翌日、フィーダー細胞のディッシュから培地を除き、ES細胞用培地を加えてヒト ES 細胞(KhES-1, KhES-2, 及び khES-3)懸濁液を播種し、CO₂ インキュベーター内で培養を行う。

6)翌日、顕微鏡下で細胞の状態を観察する。

7)継代するために、ヒト ES 細胞のコロニーがコンフルエント状態として十分に確認出来たら、培養上清を除去し、PBSで洗浄後、トリプシンとコラゲナーゼの混合液で反応し、ピペティングによる機械的刺激によりフィーダー細胞からコロニーを剥し取る。

- 8) 15ml チューブへ ES 細胞を回収し、ES細胞懸濁液を遠心(1000rpm, 3 分間、4℃)する、
- 9) 上清を出来るだけ除く
- 10) 凍結用の細胞保存液を加え、すばやく懸濁し、あらかじめ準備した凍結保存用チューブに移す。
- 11) ピンセットで凍結チューブをつかみ、液体窒素につけ 30 秒から 1 分間、内部まで完全に凍結する。
- 12) 液体窒素ありは-180℃にて保存する。

3) ヒト ES 細胞の核型分析 (15 日目)

- 1) 核型分析を行う 3 時間前に、ヒト ES 細胞を新しい培地に交換する
- 2) ES 細胞を BS で洗浄後、トリプシンとコラゲナーゼの混合液で反応し、ピペッティングによる機械的刺激によりフィーダー細胞からコロニーを剥し取る。
- 3) 15ml チューブへ ES 細胞を回収し、ES細胞懸濁液を遠心(1000rpm, 3 分間、4℃)する、
- 4) 上清を出来るだけ除きペレットにする。
- 5) ペレットを 8ml の低浸透圧性 KCl 溶液中で再懸濁し、穏やかにチューブを除き、凝集を酒、懸濁を確認する
- 6) 37℃で 10 分間チューブをインキュベートする。
- 7) 2 ml の新しく調整した固定液 (MeOH:氷酢酸、3:1) を加え、穏やかに振とう混合をする。
- 8) 細胞を遠心分離し、上清を回収する。
- 9) パスツールピペットを用いて、2ml の固定液を注意深く加え、凝集を避けるために良く混ぜる。更に、6ml の固定液を加えチューブをよく振って混ぜる。
- 10) 細胞を遠心分離し、上清を吸引する
- 11) 繰り返し 8 及び 9 の操作を 3 回繰り返す。
- 12) ペレット 1ml の固定液で再懸濁する
- 13) 細胞を広げるために、初めスライドの表面で蒸発させて、凍結乾燥させたスライドの表面を湿らせ、少しの間スライドを 45 度に傾ける。パスツールピペットを用いて、注意してスライドの表面のトップに懸濁液を 1 滴垂らし、空気感想を行う
- 14) 新しく調整した Leishmann 染色液で 8 分間スライドを染色する。
- 15) 1 分間流水洗浄をし、空気乾燥をする。
- 16) キシレンを 2 回交換してスライドをきれいにし、Depex でカバースリップをマウントする。
- 17) 核型の正常性を観察する。

環境リスク研究センターヒトES細胞使用に関する取扱い規則

第1条（目的）

この規則は、「独立行政法人国立環境研究所ヒトES細胞使用研究倫理規程」に基づき、ヒトES細胞を使用する実験の実施に関し必要な事項を定めることにより、使用の安全かつ医学的倫理に基づく適切な実施を図ることを目的とする。

第2条（適用の範囲）

すべてのヒトES細胞の使用は、この取扱規定に定めるところにより適切に実施されるものとする。

環境リスク研究センターにおけるヒトES細胞研究は、独立行政法人国立環境研究所ヒトES細胞使用研究倫理審査委員会です承された使用計画に限る。

第3条（使用者）

ヒトES細胞の使用は、独立行政法人国立環境研究所ヒトES細胞使用研究倫理審査委員会です承された使用計画書で申請された使用責任者、使用分担者、研究者に限る。

第4条（使用の場所）

ヒトES細胞の使用は、使用計画書に記載されたヒトES細胞専用実験室において実施するものとする。それ以外の場所では行わない。

第5条（使用の記録とその保存）

使用責任者、使用分担者及び研究者は、ヒトES細胞の使用に関する記録（別紙参照）を作成する。これを保存するものとする。また、ヒトES細胞の使用に関する資料の提出、調査の受入れなどの文部科学大臣が必要と認める措置について要請があった場合には協力するものとする。

第6条（使用完了後のヒトES細胞及び分化細胞の取扱い）

使用責任者、使用分担者及び研究者は、ヒトES細胞の使用を完了後使用計画書に定めた方法により廃棄する。又、分化細胞の取扱いは、別に定めた独立行政法人国立環境研究所ヒトES細胞使用研究倫理規程にもとづいて保管する。

第7条（雑則）

（施行期日）

この規則は、承認の日から施行する。

環境リスク研究センターヒト ES 細胞使用記録・保管用紙

No. _____

日時	平成 年 月 日	
使用者氏名		
使用者所属		
使用計画課題名		
使用したヒト ES 細胞株名		
操作	解凍培養 ・ 凍結保存	
解凍培養の場合		
	凍結チューブ型およびラベル番号*)	チューブ型 : ラベル : 本
	培養液組成ならびにフィーダー細胞名	
凍結保存の場合		
	凍結チューブ型およびラベル番号*)	チューブ型 : ラベル : 本
	凍結保存溶液組成	
	凍結方法	
保管用液体窒素タンク番号		
備考		

*) 複数本使用あるいは保存した場合はすべてのラベル番号と本数を記載。

これまでに実施した教育研修の一覧

年度	日時	場所
平成20年度	平成20年8月8日	研究本館2F230-1
平成21年度	平成22年3月29日	環境リスク研究棟 3Fリスク棟会議室
平成22年度	平成23年3月30日	環境リスク研究棟 3Fリスク棟会議室
平成23年度	平成24年3月22日	環境リスク研究棟 3Fリスク棟会議室

研修資料・材料

先端医療のルール 人体利用はどこまで許されるのか

平成20年8月8日

ヒトES使用研究倫理研修会

講師 環境リスク研究センター 曾根秀子

- ぬで島次郎著：先端医療のルール 講談社現代新書
- 赤林朗編『入門・医療倫理』、勁草書房、2005年
- 赤林朗編『入門・医療倫理II』、勁草書房、2007年
- 赤林朗総監修『生命・医療倫理学入門』、丸善、2005年
- 赤林朗他監訳『臨床倫理学』、新興医学出版、2006年
- トニー・ホーブ著：『1冊で分かる医療倫理』、岩波書店、2007年
- 日弁連の「人権擁護大会宣言・決議集」と東京財団の「生命倫理の土台作りプロジェクト」

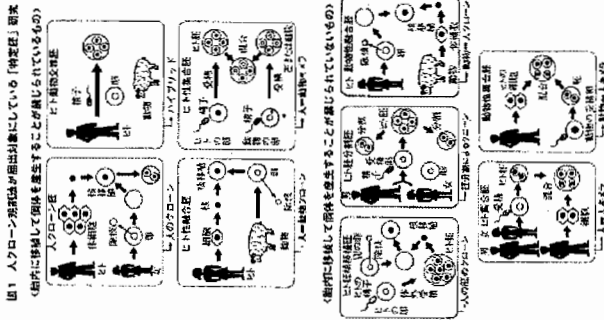
1

2

日本の生命倫理

- ・ クローン規制法の矛盾 図1
- ・ 生殖技術はどこまで許されるか
- ・ 臓器移植法の三つの欠落
- ・ 人体の商品化を認めるか、認めないか
- ・ 「生命倫理」という言葉の意味するところ

3



4

第2回ヒトES細胞使用研究倫理研修会のご案内

ヒトES細胞の使用に関する指針の内容の理解を深め、使用機関内における法令遵守の体制の確立と徹底化を行う目的で、主にヒトES細胞使用研究における使用責任者、使用分担者及び研究者を対象に、下記の要領で研修会を開催します。尚、本研修会は、ご興味のある方ならばどなたでもご参加いただけます。皆様、奮ってご参加ください。

月日：平成22年3月29日（月）

時間：13:00～15:00

場所：環境リスク研究棟 3Fリスク棟会議室

1) ヒトES細胞の使用に関する指針改定版の確認

平成21年8月に行われたヒトES細胞の使用に関する指針改定版とその手引き書

2) 医療関係者などの専門家による生命倫理（Bioethics）に関するビデオ視聴

東京大学における研究倫理教育の実例-（30分程度）

ヒトES細胞使用倫理委員会幹事 青木康展

第3回ヒトES細胞使用研究倫理研修会のご案内

ヒトES細胞の使用に関する指針の内容の理解を深め、使用機関内における法令遵守の体制の確立と徹底化を行う目的で、主にヒトES細胞使用研究における使用責任者、使用分担者及び研究者を対象に、下記の要領で研修会を開催します。尚、本研修会は、ご興味のある方ならばどなたでもご参加いただけます。皆様、奮ってご参加ください。

月日：平成23年3月30日（水）

時間：13:00～15:00

場所：環境リスク研究棟 3Fリスク棟会議室

- 1) ヒトES細胞の使用に関する指針改定版の確認
平成22年5月に発行されたヒトES細胞の使用に関する指針改定版とその手引き書
- 2) 医療関係者などの専門家による生命倫理（Bioethics）に関するビデオ視聴
東京大学における研究倫理教育の実例-（30分程度）

ヒトES細胞使用倫理委員会幹事 青木康展

第4回ヒトES細胞使用研究倫理研修会のご案内

ヒトES細胞の使用に関する指針の内容の理解を深め、使用機関内における法令遵守の体制の確立と徹底化を行う目的で、主にヒトES細胞使用研究における使用責任者、使用分担者及び研究者を対象に、下記の要領で研修会を開催します。尚、本研修会は、ご興味のある方ならばどなたでもご参加いただけます。皆様、奮ってご参加ください。

月日：平成24年3月22日（木）

時間：13:30～16:30

場所：環境リスク研究棟 3Fリスク棟会議室

[特別講演] 13:30～14:30

先端研究と生命倫理について

講師：東京医科歯科大学生命倫理研究センター 小笹 由香先生

[研修内容] 15:00～16:30

1) ヒトES細胞の使用に関する指針の確認

平成23年度最新版（H23.9）のヒトES細胞の使用に関する指針改定版とその手引き書

2) 医療関係者などの専門家による生命倫理（Bioethics）に関するビデオ視聴

東京大学における研究倫理教育の実例-（30分程度）

ヒトES細胞使用倫理委員会幹事 青木康展

（問合せ先 曾根秀子 内線2464）

平成 24 年度 第 1 回ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会 議事要旨

日時：平成 25 年 1 月 15 日（火）11:30-12:00

場所：国立環境研究所特別会議室

出席者：住委員長、鏑木、新田、高村、滝村、川嶋、中山、川村、（外部委員）稲葉、小笹、菊田、（研究代表者）曾根、（事務局）青木、（オブザーバー）田村

欠席者：久保田、（外部委員）土屋、中川

資料

資料 1 委員名簿

資料 2 独立行政法人国立環境研究所ヒト ES 細胞使用研究倫理規定

資料 3 研究従事者変更履歴

資料 4 ヒト ES 細胞使用報告書

参考資料 1 ヒト ES 細胞使用計画書

参考資料 2-1、2-2 これまでに実施した教育研修の一覧

議題：

1. 本委員会の検討内容について
事務局より、資料 2 により「ヒト ES 細胞使用研究倫理規程」（以下「規程」）にある本委員会の役割、及び本日の議題 2 及び 3 は、「規程」に定められた報告事項であることを説明した。
特に、質問はなかった。
2. 研究計画（研究従事者）の変更について
事務局より、資料 3 により「ヒト ES 細胞使用計画書」（参考資料 1）にある研究の従事者の変更履歴、および研究機関の長の変更を文部科学省に随時報告したことを説明した。
特に、質問はなかった。
3. ヒト ES 細胞使用研究の進捗状況の報告（資料 4）
研究代表者（曾根主任研究員）より、資料 4 により「ヒト ES 細胞使用計画書」にある研究の進捗状況を報告した。
研究の科学的成果について質疑応答があった。
委員より当該研究計画は延長する否かの質問があり、研究代表者より延長することを考えている旨の回答があった。事務局より、以前と異なり現行の指針の下では、新規の研究計画について文部科学省の審議会で審議を受ける必要はなく、本委員会の審議の後、文部科学省に報告することとなった旨、事務局より補足説明した。
委員より、「ヒト ES 細胞使用報告書」には今後ヒト iPS 細胞を使用したいとの記述があることから、単に現「ヒト ES 細胞使用計画書」の延長として次期研究計画は取り扱えないと指摘された。研究代表者より、新規の研究計画として本委員会で審議を受けると回答があった。事務局より、新規の研究計画として慎重に取り扱いたいと回答した。
4. 教育訓練の実施について（参考資料 2）
研究代表者より、参考資料 2-1、2-2 により、これまで実施した教育研修の内容が報告された。
5. 事務局より、来年度以降は研究計画の進捗状況について、年 1 回メール等で委員に報告したい旨提案があり、了承された。また、委員長より、次回以降の委員会では審議の時間に余裕を持つよう指摘があり、事務局より、そうする旨を回答した。