

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立

令和 6 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 戸塚 ゆ加里

令和 7 (2025) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規i有害性評価手法の確立	
戸塚 ゆ加里	1
II. 分担研究報告	
1. ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発	14
戸塚 ゆ加里	
2. 毒性評価・ゲノム発現解析	19
藤岡 正喜	
3. オルガノイド培養・エピゲノム変異解析	23
成瀬 美衣	
4. In vivo毒性試験	25
美谷島 克宏	
5. 一次線毛のオルガノイドへの応用	27
広川 佳史	
6. 一次線毛の分子基盤解析	29
西村 有平	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	30

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立

研究代表者 戸塚 ゆ加里 ……………星薬科大学 薬学部 教授

研究要旨

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護 3Rs (Replacement・Reduction・Refinement) の観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。動物実験の代替手法として、オルガノイドを活用した *in vitro* での毒性・発がん性評価法が注目されている。本研究では、マウス肝臓由来オルガノイドを用いて、新たな毒性・発がん性評価系の確立を目的とし、特に変異シグネチャー解析 (ecNGS)、エピゲノム変化の検出、および一次線毛構造の変化に着目した多面的な検討を行った。

まず、評価系の基盤となるオルガノイドの安定性を確認するため、2 施設（星薬科大学、国立がん研究センター）にて同一プロトコールで培養されたマウス肝臓オルガノイドの遺伝子発現および形態を比較解析した。その結果、主要なマーカー遺伝子 (Sox9, Hnf4a, Alb など) の発現や形態に顕著な差異は認められず、継代を経ても安定した状態が維持されることが確認された。次に、代表的な 5 種の化学物質であるフェノバルビタール (PB)、カルバミン酸エチル (EC)、モノクロタリン (MCT)、クマリン (CMR)、アセトアミノフェン (APAP) を用いて細胞毒性試験を行った結果、いずれも濃度依存的な細胞生存率の低下が認められた。また、小核試験では、EC、MCT、CMR、および APAP において小核出現頻度の上昇が確認され、非遺伝毒性物質である PB では対照と同程度であったことから、オルガノイドを用いた小核試験の有用性が示された。さらに、MCT 曝露群に対して ecNGS を実施したところ、1 塩基置換頻度の上昇とともに C>A 変異における変異シグネチャーの変化が検出され、オルガノイド系においても高精度なゲノム変異解析が可能であることが示された。網羅的遺伝子発現解析では、*in vitro* のオルガノイドと *in vivo* マウス肝臓組織との間で、肝障害や脂肪肝 (hepatic steatosis)、異物代謝関連経路の活性化など共通の応答が確認された。特に PB 曝露においては、両者の発現パターン的一致が顕著であり、オルガノイド系の妥当性を支持する結果となった。エピゲノム解析としては、PB を 3 回曝露したオルガノイドと、同物質を反復投与したマウス肝臓 (C57BL/6) を対象に、RRBS 法 (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) により CpG メチル化パターンを比較した。メチル化率に有意差が認められた領域は限定的で、両者に共通する変化は確認されなかったが、今後の条件最適化により指標としての活用が期待される。さらに、新たな評価指標として注目される一次線毛については、ゼブラフィッシュやマウス肝臓オルガノイドを用いて形態を定量的に評価した。ゼブラフィッシュでは EC やトリクロロエチレン曝露による一次線毛の短縮が確認され、オルガノイドにおいては PB 高濃度曝露により中心小体数の増加が観察された。これは染色体不安定性やがん化との関連が指摘されており、今後の毒性指標としての有用性が示唆された。

以上の結果から、マウス肝臓オルガノイドは、ecNGS、小核試験、遺伝子発現解析などを組み合わせることで、化学物質の毒性・発がん性を多角的に評価可能な有力な *in vitro* モデルであることが明らかとなった。今後、共培養系や新規バイオマーカーの導入によって、より生体に近い応答系の構築が進めば、動物実験の代替手法として社会的にも高い価値を持つ評価系となることが期待される。

研究分担者
 藤岡 正喜 大阪公立大学大学院
 医学研究科
 分子病理学 講師
 成瀬 美衣 国立感染症研究所・ウイルス第一部・
 主任研究官
 美谷島克宏 東京農業大学応用生物科学部
 食品安全健康学科 教授
 広川 佳史 三重大学大学院医学系研究科 准教授
 西村 有平 三重大学大学院医学系研究科
 統合薬理学教授

A. 研究目的

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護3Rs (Replacement・Reduction・Refinement)の観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。しかしながら、実験動物に一定期間繰返して被験物質を投与する反復投与毒性試験やがん原性試験等については、現在のところ確立された *in vitro* 試験法がなく、多数の被験物質のヒトでの毒性を予測するためにも、革新的な試験法の開発が期待されている。

申請者らはこれまでに、マウス正常組織(肺、肝臓、乳腺等)由来のオルガノイドを用いた発がん性試験法を開発し、当該評価系が化学物質の安全性評価に妥当・有用であることを見出している。具体的には、オルガノイドに化学発がん物質を曝露後ヌードマウスの皮下に接種する方法で、病理組織学的変化をエンドポイントとする *in vitro* 化学発がんモデルを諸外国に先駆けて提案した (Naruse M, Imai Tら、2020)。また、レポーター遺伝子導入マウスのオルガノイドを用いて遺伝毒性試験を実施した結果、細菌や哺乳類細胞を用いる既存の試験法では検出できず、*in vivo* モデルでのみ検出できる化学物質の点突然変異をオルガノイドでは陽性と判定できることを明らかにした (Komiya M, Totsuka Yら、2021)。さらに、化学物質による *in vivo* における毒性、発がん性は標的細胞に対する直接作用に加え、共存する免疫系細胞や間質細胞等の影響を受ける場合があり、それらの細胞群とオルガノイドとの共培養系を用いることで、生体微小環境の構築を目的とした評価系、またエピゲノム変化評価系の構築にも取り組んでいる。

本研究においては、これらに加え、これまで毒性評価に応用されていない一次線毛に着目し、化学物質の安全性評価法構築への応用も検討する。一次線毛は細胞膜上の突起物で、細胞内シグナルのハブと認識され、腫瘍細胞では発現が消失するなど各種生命現象への関与が報告されている。申請者らはこれまでに、一次線毛の動態と細胞周期制御の分子レベルでの解析や、一次線毛の存在を特異的抗体により定量手法する検討も開始している。発がん性スクリーニングである各種発がん性中期試験法において、前がん病変マーカーが重要な役割を果たしているが、この一次線毛の発現は、それに匹敵する発がん予測マーカーとなる可能性

に加えて、臓器横断的に応用が可能であると期待できる。

以上の背景より、本研究では、これら先行研究により有用性が示されたマウス肺及び肝臓オルガノイドおよび免疫系や間質細胞等との共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立を目指す。さらに、一次線毛発現がオルガノイドを用いた新規評価系の有用なエンドポイントとなり得るかどうかについても検討を行う。

B. 研究方法

今年度は昨年度検討した継代・培養方法を用い、各施設で使用する被験物質が同じになるように調整して研究を実施した。

各施設で使用した化学物質は以下の表にまとめる。

表1 各施設における評価方法と使用した化学物質

実験施設	評価方法	使用化学物質
星薬科大学	オルガノイドを用いた遺伝毒性	フェノバルビタール(PB)、カルバミン酸エチル(EC)、モノクロタリン(MCT)、クマリン(CMR)
国立がん研究センター(国立感染症研究所)	オルガノイドを用いたエピゲノム変化	PB
大阪公立大学	マウスおよびオルガノイドを用いた遺伝子発現変化	PB, EC, MCT, CMR, アセトアミノフェン(APAP)
東京農業大学	<i>In vivo</i> 毒性試験	PB, EC, MCT, CMR, APAP, アクリルアミド
三重大学	一次線毛の分子基盤解析とオルガノイド評価系への応用	PB, EC, MCT, CMR

1. ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発

① マウス肝臓オルガノイドの安定性評価

本研究では標準的な毒性試験法の開発を目指していることから、オルガノイドの品質が安定であることが望ましい。しかしながら、オルガノイドは培養条件などにより遺伝子発現に影響することが知られていることから、使用前にその品質について確認する必要があると考えた。そこで、2施設間(星薬科大学と国立がん研究センター)で同一の実験プロトコルに従い培養したオルガノイドの安定性について、各種遺伝子を分子マーカーとして評価した。

凍結日と継代数が異なる凍結マウス肝臓由来オルガノイド(2本)を各々ドーム型培養で播種し、1週間ごとに3週間継代を行った。播種ならびに継代時に形態学的観察を行い、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析のためオルガノイドを回収した。遺伝子発現解析の対象として、肝細胞マーカー(*Hnf4a*, *Ttr*)、前駆肝細胞マーカー(*Sox9*)、成熟肝細胞マーカー(*Alb*, *Cyp3a11*)、胆管マーカー(*Krt19*)の遺伝子発現量を播種時の発現量と比較して評価した。なお、内部標準遺伝子は *18S rRNA* を用いた。また、同じマーカー遺伝子を用いてマウス肝組織における遺伝子発現との比較も行った。

② 細胞毒性試験

オルガノイドを播種後2時間培養し、S9mix存在下で被験物質として、フェノバルビタール(PB, 236, 4

72, 943 μM)、カルバミン酸エチル(EC, 25, 50, 100 mM)、モノクロタリン(MCT, 125, 250, 500 μM)、クマリン (CMR, 50, 100, 200 μM)、アセトアミノフェン (APAP, 10, 20, 40 mM)を24時間曝露し洗浄後、トリプシンを用いてシングルセルにして、トリパンブルー色素排除法を用いて評価を行った。

③ 小核試験

オルガノイドを播種後3日間培養し、S9mix存在下被験物質として、PB(236, 943 μM)、EC(25, 100 mM)、MCT(125, 500 μM)、CMR(50, 200 μM)、APAP(10, 40 mM)を24時間曝露し洗浄後、新しい培地で2日間培養し、シングルセルにして細胞を回収した。回収した細胞はサイトスピン法によりスライドガラスに固定後、ギムザ染色を行った。評価は、光学顕微鏡下で各スライドにつき2,000個の細胞を観察し、小核を保有する細胞数を計測し、算出した小核保有細胞の頻度(小核出現頻度)を指標に行った。

④ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析

マウス肝臓オルガノイドにS9mix存在下で、MCTの3回曝露実験を行った。播種後3日間培養したオルガノイドへ1回目の曝露(24時間)を行い、洗浄した後に新しい培地を添加した。3日間培養した後、オルガノイドを回収し再播種を行った。3日後、2回目の曝露(24時間)を行い、洗浄後に新しい培地を添加した。6日間培養後、3回目の曝露(24時間)を行い洗浄した後、TrypLEを用いてオルガノイドを回収した。なお、化学物質の培地中最終濃度は125, 500 μM とした。回収したオルガノイドよりAllPrep DNA/RNA Kit(QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出し、ec-NGS(Nano-Seq)解析を行った。

2. マウスオルガノイドを用いた毒性評価と遺伝子発現解析

[材料と方法]

本研究で使用した被験物質について、下記に記す。

- Phenobarbital Sodium (PB) (CAS RN : 57-30-7)
- Coumarin (CMR) (CAS RN : 91-64-5)
- Acetoaminophen (APAP) (CAS RN : 103-90-2)

上記化学物質を用いて、4週間(PB, APAP)あるいは13週間(CMR)マウスに投与した肝臓を東京農業大学美容島教授より供与いただいた。受領した肝臓よりmRNAを抽出し、*in vivo*マウス肝臓mRNAとして、以降に記す解析を行った。

加えて、PBおよびCMRをそれぞればく露させたマウス肝臓オルガノイド由来mRNAを星薬科大学戸塚教授より供与いただいた。受領したmRNAを*in vitro*マウス肝臓mRNAとして用いて以降に記す解析を行った。

[網羅的遺伝子発現解析]

回収した*in vivo*マウス肝臓由来mRNAのうち、PB、CMRおよびAPAP投与群における対照群および高用量群をそれぞれ用いて(計5検体)、Clariom™ D Assay, Mouse (ThermoFisher)マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。Expression Console™を用いて、数値化および正規化を行った。アルゴリズム

は、SST-RMAを用いた。Annotation Levelは、(Exon Levelではなく)Gene Levelとした。得られた遺伝子発現パラメータを用いてIngenuity Pathway Analysis (IPA)ソフトウェアを用いて、パスウェイ解析及び各被験物質ばく露による影響について検討を行った。加えて、昨年度実施したマウス肝臓オルガノイドを用いたマイクロアレイおよびパスウェイ解析で得られたデータを用いて、*in vivo*および*in vitro*双方でどのような影響がみられたか、検討を行った。

3. マウスオルガノイドを用いたエピゲノム変化評価系の構築

マウス臓器由来オルガノイドに化学物質を反復曝露した後、エピゲノム変化を同定し、*in vitro*一般毒性試験法における指標を探索する。

① オルガノイドへのフェノバルビタール (PB) 処置

昨年度研究代表者から分与を受けたMouse Hepatic Organoids (STEMCELL Technologies ST-70932, C57BL/6マウスの肝臓由来)を用いた。PB曝露法については研究代表者が検討した方法に準じ、ドーム型培養法でオルガノイドを3日間培養し、1回目の24時間曝露を各対照群(0 μM)、低用量(236 μM)、高用量(943 μM)の濃度で曝露した。24時間後培地の除去、洗浄後新しい培地を添加し、3日間培養を行った。3日間培養後、細胞を再播種し、3日間培養後に2回目の24時間曝露を行った。その後培地を除去、洗浄後、新しい培地を添加し、6日間培養後に、3回目の24時間曝露を行った。曝露後、培地を除去、洗浄後にセルリカバリーソリューションを用いてマトリゲルを溶解し、オルガノイドを細胞塊として回収し凍結した。

(倫理面への配慮)

本年度は分与されたオルガノイドを使用して実験を進めており、動物実験は行っていない。

② PB処置オルガノイドのメチル化解析

PB3回処置後(0 μM , 243 μM , 943 μM , 各N=3)のオルガノイドの細胞塊から、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。メチル化解析はRRBS法(Reduced Representation Bisulfite Sequencing)を用いた。RRBS法では、制限酵素MspIによる制限酵素消化を行い、フラグメントのサイズ選択を行うことでCpGの豊富な領域を選択することで効率的にCpGサイトのシーケンスを行っている。バイサルファイト処理により、サイズ選択したDNAの非メチル化シトシンをウラシルに変換し、PCR増幅を経て次世代シーケンスを行い、Bismarkを用いてMouse genome (mm10)にアライメントした。次にMethylKit Analysisによるメチル化解析を行い、対照群に対し有意にメチル化率が変化する塩基または領域の同定を行った(q-value<0.01, % methylation difference >25%)。領域ベースの解析についてはゲノムを任意の1kbpに区切り比較を行った。同定した候補はIGV(Intergrative Genomics Viewer)を用いて確認を行った。

③ PB処置マウス肝臓のメチル化解析

PBによる *in vivo* 毒性試験(対照群 PB 0ppm, 高用量 PB 1000ppm, 各N= 5)を行ったC57BL6マウスの凍結肝臓の一部を分担研究者:美谷島から分与を受け、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。その後のメチル化解析については②と同様の手順で行った。

4. *In vivo* 毒性試験

分担研究者として、美谷島はオルガノイドによる新規試験法との類似性を確認するため、毒性対照物質を用いてマウス *in vivo* 毒性試験を実施し、標的臓器である肝臓についての毒性学的データを取得した。

1) *In vivo* 毒性試験

これまで本分担研究では、雄性 C57BL/6J マウスに、*in vitro* 試験と共通してフェノバルビタール(PB)、カルバミン酸エチル(EC)、クマリン(CMR)、モノクロタリン(MCT)を投与し。さらに、肝細胞壊死など顕著な肝毒性を示す化学物質としてアセトアミノフェン(APAP)を投与し、それぞれの化学物質の肝毒性プロファイルを明らかにしてきた。特に本年度のマウスへの投与は、CMR 並びに MCT について反復投与を行い、それぞれの肝臓毒性を評価した。

1-1) CMR を用いた検討

本分担研究では、マウスに CMR を短期間反復投与することにより生じる肝臓への影響を解析した。具体的な研究内容として、6 週齢の雄性 C57BL/6J 系マウスに、CMR を 5,000 ppm で 4 週間、2,500 ppm 並びに 5,000 ppm で 13 週間混餌投与した。対照群には標準飼料として粉末 CE-2 を与えた。給餌期間終了後に解剖し、採血並びに臓器の採取を行った。肝臓については病理組織学的解析並びに遺伝子発現解析を行った。

1-2) MCT を用いた検討

本分担研究では、マウスに MCT を 2 ないし 4 週間間歇的に反復投与することにより肝臓への影響を解析した。具体的な研究内容として、6 週齢の雄性 C57BL/6J 系マウスに pH を調製した生理食塩水に溶解して MCT を 200 mg/kg の用量で 2 ないし 4 週間にわたり週 1 回の間歇腹腔内投与を行った。対照群には同溶媒を投与した。飼料は固形標準食(CE-2)を用いた。投与期間中に体重及び摂水量を測定した。投与期間終了後に解剖し、臓器重量、

血液生化学的検査、病理組織学的解析及び遺伝子発現解析を行った。

5. 新規 *in vivo* 有害性評価手法の確立と一次線毛のオルガノイド評価系への応用検討

① 新規 *in vivo* 有害性評価手法の確立:

様々な細胞の一次線毛に EGFP を発現するゼブラフィッシュの組織切片を作製し、EGFP に対する抗体を用いた免疫染色により、一次線毛を可視化した。画像解析ソフト (CiliaQ) を用いて、一次線毛の形態を定量的に解析した。また、カルバミン酸エチルやトリクロロエチレンをゼブラフィッシュに曝露(受精後 3 日目から 7 日目まで)し、脳における一次線毛の形態変化を解析した。

② 一次線毛のオルガノイド評価系への応用:

分担研究者より提供を受けた、発がん性化合物処理のマウス肝前駆細胞オルガノイド標本を用いて一次線毛を構成する軸糸(抗 α -acetylated tubulin 抗体)、中心小体(抗 γ -tubulin) に対する蛍光免疫染色をおこなった。また中心小体の増幅に関与する Polo-like kinase 4 に対する抗体を用いて蛍光免疫染色をおこなった。化合物はフェノバルビタール、カルバミン酸エチル、モノクロタリン、クマリンである。

(倫理面の配慮)

本研究で行う動物実験の実施にあたり東京農業大学と三重大学における動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出し、理事長の実施承認を得た。実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、屠殺は頸椎脱臼やイソフルラン麻酔下にて腹部大動・静脈からの脱血により行うなど動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号、平成29年最終改正法律第41号)等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、各施設の機関承認を得た後に実施した。

研究結果

1. マウスオルガノイドの化学物質暴露

① マウス肝臓オルガノイドの安定性評価

オルガノイドをドーム型培養法により培養し、継代時に形態学的変化を観察した結果、図1のように播種後3週間におけるオルガノイドの形態学的変化は認められなかった。

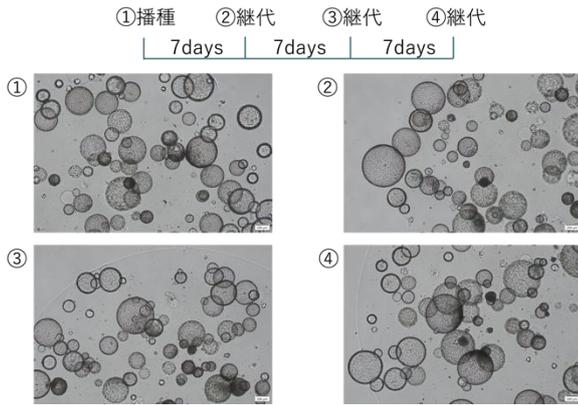


図1. オルガノイドの形態学的変化

オルガノイドの各種マーカー遺伝子発現は、同一プロトコルを用い、2施設で培養したオルガノイドにおける播種時と継代時で相対比較した。その結果、図2に示すように両施設において、*Sox9*(前駆肝細胞マーカー)、*Krt19*(胆管マーカー)、*Ttr*(肝細胞マーカー)は、継代を繰り返しても両施設間で大きな増減は認められなかった。一方、*Alb*(成熟肝細胞マーカー)、*Hnf4a*(肝細胞マーカー)および*Cyp3a11*(成熟肝細胞マーカー)に関しては、両施設ともに播種時と比較し、継代ごとにやや変動が認められた。

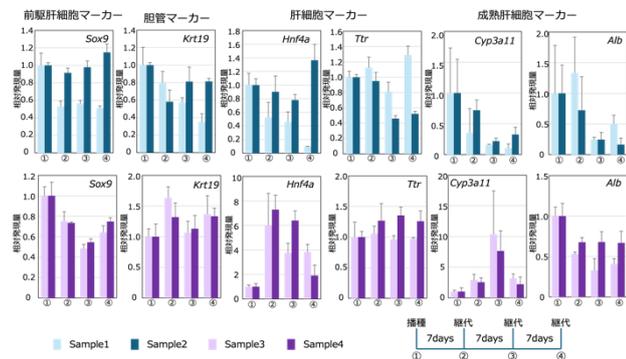


図2. 未分化オルガノイドの遺伝子発現 (上段：星薬科大学，下段：国立がん研究センター)

② 細胞毒性試験

化学物質を曝露させた結果、図3に示すように各化合物とも濃度依存的に細胞生存率が減少した。

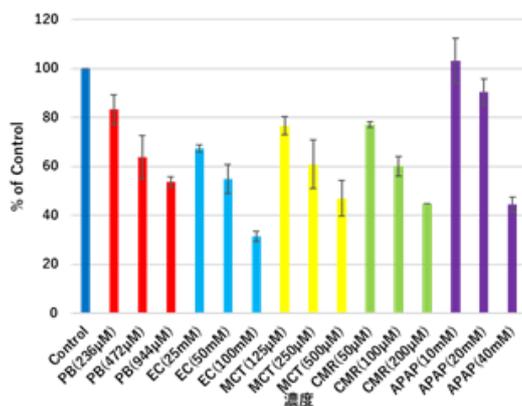


図3. 化学物質曝露による細胞毒性試験

③ 小核試験

化学物質を曝露させた結果、図4に示すような小核が出現し、小核出現頻度は、遺伝毒性発がん物質 (EC, MCT, CMR) および肝毒性物質であるAPAPでは曝露により上昇していた (図5)。APAPは、細胞毒性が見られなかった低濃度曝露では小核発生頻度に大きな上昇は見られなかったが、細胞毒性が強く示された高濃度曝露では小核発生頻度が上昇し、細胞毒性と小核発生頻度の相関が認められた。なお、非遺伝毒性肝発がん物質であるPBはコントロールとほぼ同程度の小核出現頻度であった。

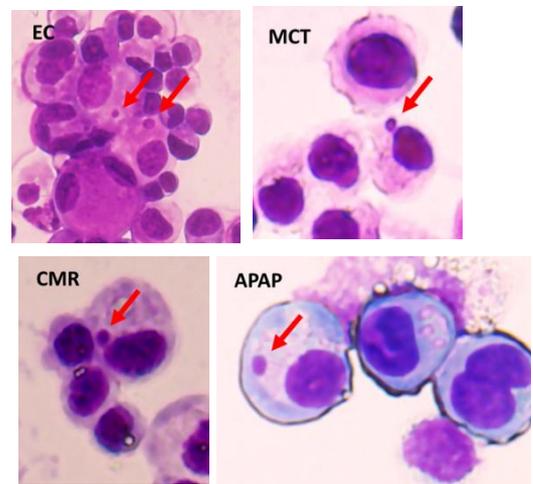
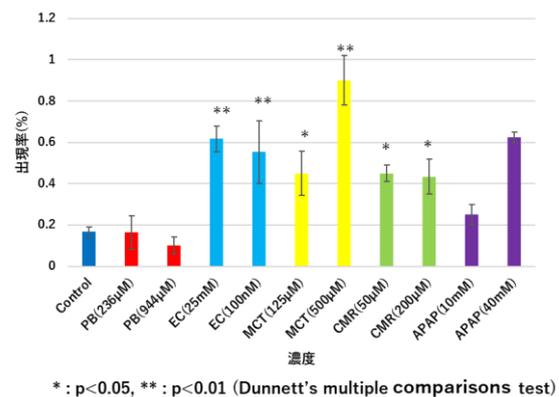


図4. 化学物質曝露による出現した小核



* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (Dunnett's multiple comparisons test)

図5. 小核試験

④ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析

小核試験で小核出現頻度が高かった MCT について ec-NGS によりゲノム変異の解析を実施した。その際の1塩基置換変異頻度を図6に示す。コントロール (DMSO) と比較して MCT を曝露することで変異頻度が上昇した。図7はゲノム変異データから変異シグネチャー解析を実施した結果を示す。コントロールのパタ

ーンと比較すると、C>Aにおいて変異シグネチャーパターンが異なることが認められた。

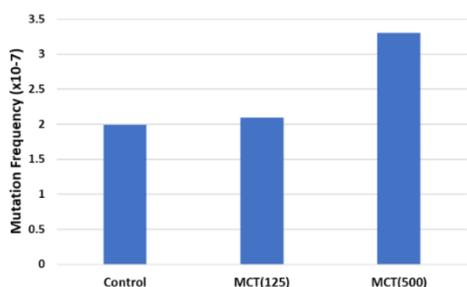


図6. 1塩基置換変異頻度

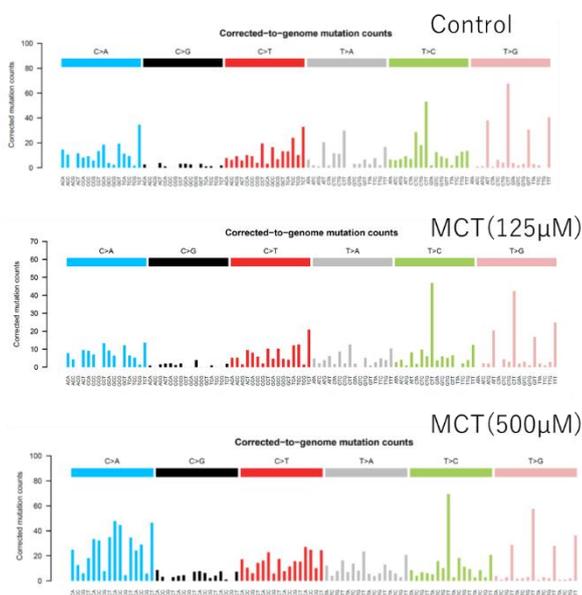


図7. Error-Corrected NGS (Nano-Seq)による変異シグネチャーパターン

2. マウスオルガノイドを用いた毒性評価と遺伝子発現解析

*in vivo*マウス肝臓mRNAを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果(表1)、CMR投与において発現量比1.50以上の遺伝子は305、0.66以下の遺伝子は213であった。同様に、PB投与において発現量比1.50以上の遺伝子は398、0.66以下の遺伝子は302であった。またAPAP投与において発現量比1.50以上の遺伝子は341、0.66以下の遺伝子は318であった。IPAソフトウェアによるTox Functions解析の結果、3つの物質(CMR、PBおよびAPAP)で共通して活性化が予測された機能として、Conjugation of glutathioneが挙げられた。これは昨年度に実施した*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおいて肝発がん物質であるCMRおよびPB、MCTの3つで共通して変動がみられた機能である。同様に、不活性化がみら

れた機能としてCell death of liverが挙げられた。

3つの化学物質ばく露で共通して変動がみられた遺伝子として55の遺伝子が同定され、KEGG_PATHWAY解析の結果、P450を介した代謝や異物代謝シグナル、活性酸素種(ROS)の産生に関わるシグナルに関連する遺伝子であることが明らかとなった。また3物質に共通する上流遺伝子について、Upstream regulator解析を実施した結果、NR1/3やNR1/2、AHRなどの異物代謝に関わる遺伝子の活性化が確認できた。また、肝発がん物質であるCMRおよびPBに共通する遺伝子セットについてTox Functions解析した結果、Hepatic steatosisの活性化が挙げられた。これは昨年度に実施した*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおいて肝発がん物質であるCMR、PBおよびMCTの3つで共通して変動がみられた機能と一致する結果である。

表1 網羅的遺伝子発現解析の結果

	物質名	Expression ratio (かつ Z score > 2)	遺伝子数
遺伝毒性肝発がん物質	クマリン (CMR)	1.50 以上	305
		0.66 以下	213
非遺伝毒性肝発がん物質	フェノバルビタール (PB)	1.50 以上	398
		0.66 以下	302
非遺伝毒性非肝発がん物質	アセトアミノフェン (APAP)	1.50 以上	341
		0.66 以下	318

昨年度実施した*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおける網羅的遺伝子発現解析との比較の結果、PB投与においては共通して発現変動を示すシグナルとして、Liver Regeneration, Inflammation liver, Hepatic steatosisがみられ、*in vivo*(マウス4週間ばく露)で得られた結果と*in vitro*(マウス肝臓オルガノイド)が良好に一致することが示された。一方、CMR投与においては共通して発現変動を示すシグナルはみられなかった。さらに、*in vivo*(マウス4週間ばく露)および*in vitro*(マウス肝臓オルガノイド)の両方で発現が確認できた遺伝子(PBでは30遺伝子、CMRでは31遺伝子)について相関解析を実施した結果、PBでは0.142、CMRでは0.386と弱い正の相関が得られた。加えて、PBではHepatocellular carcinoma関連シグナルに限定して相関解析を行った結果、0.516と正の相関が得られた。以上の結果から、マウス肝臓オルガノイドで得られた知見は、*in vivo*試験で得られた結果と相関することが確認できた。

3. マウスオルガノイドを用いたエピゲノム変化評価系の構築

① PB処置オルガノイドのメチル化解析

PB処置3回後の(0µM, 236µM, 943µM, 各N=3)オルガノイドのRRBS解析によるメチル化解析を行った。その結果、染色体毎のメチル化レベルの差は各群で有意な差は見られなかった。CpGサイト全体のメチル化率によるPCA解析からも各群を特徴づける有意な差は見られなかった。対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は479箇所、領域ベースで有意に差がある領域は1箇所であった。

② PB処置マウス肝臓のメチル化解析

PBによる *in vivo* 毒性試験(対照群 PB 0ppm, 高用量 PB 1000ppm, 各N= 5)を行ったC57BL6マウス肝臓のRRBS解析によるメチル化解析を行った。その結果、染色体毎のメチル化レベルの差は群間における有意な差は見られなかったが、高用量5検体のうち1検体のみが他と異なり全体的に高いメチル化を示していることがわかった。CpGサイト全体のメチル化率によるPCA解析からも同様に、群間の有意な差はないものの、高用量5検体のうちの1検体が他との差が大きいことがわかった。

対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は4007箇所、領域ベースで有意に差がある領域は91箇所であった。有意差があるものについても、高用量5検体のうちの1検体が他との差が大きいことに依存している傾向が見られたため、高用量5検体のうちの1検体を除いた解析も行なった。対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は2箇所、領域ベースで有意に差がある領域は0箇所であった。

③PB処置オルガノイドとPB処置マウス肝臓のメチル化解析の比較

PB処置3回後の対照群と高用量群の間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は479箇所と、PB処置マウス肝臓の対照群と高用量群の間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は4007箇所のうち、一致する塩基はなかった。また、領域ベースの比較で有意にメチル化が変化する領域1箇所(オルガノイド)と91箇所(肝臓)においても一致する領域はなかった。PB処置マウス肝臓の高用量5検体のうち1検体のみが全体にメチル化率が高く、2群間の比較に影響が出ているようであったため、その1検体を除く解析を行なったが、やはり同様に共通したメチル化変化はなかった。

4. In vivo毒性試験

①CMRを用いた検討

CMRの反復投与により、体重は対照群に対し4及び13週間群ともに減少傾向にあった。肝臓重量は、対照群に対し13週間5,000 ppm群で増加傾向にあった。肝臓の病理組織学的検査では、4週間投与による明らかな変化は見られなかったが、13週間5,000 ppm群で、小葉周辺性の肝細胞肥大、巣状壊死及び炎症性細胞浸潤が認められた。血液生化学的検査では、対照群に対し5,000 ppm群でALT活性が増加ないし増加傾向にあった。FABP2の免疫組織化学染色では、全CMR投与群でより広範囲に陽性肝細胞が確認された。遺伝子発現解析では、肝細胞分化の指標となる因子であるHptr, A1b, CYP3A11, Krt19, Hnf4aは4週間5,000 ppm群で減少傾向を示し、Sox9は4及び13週間5,000 ppm群で増加傾向を示した。

②MCTを用いた検討

MCTの反復投与により、体重は、対照群に対し4週間投与群で減少傾向を示した。摂餌量は、対照群に対し2週間投与群で減少傾向を示した。血液生化学的検査では、対照群に対しALT及びASTが2週間投与群で増加傾向を示したが、4週間投与群では明らかな変化は見られなかった。臓器重量では、両投与期間で明らかな影響は見られなかった。病理組織学的解析では、2週

間投与群で巣状性肝細胞壊死、4週間投与群で、主に小葉中心性肝細胞のグリコーゲン蓄積の減少が認められた。さらに、対照群に対し両投与期間において2核肝細胞の増加が見られた。さらに、細胞増殖に関わるPCNAの免疫組織化学染色において、対照群に対し両投与期間において陽性細胞が増加傾向を示し、それは2週間投与群でより顕著であった。これに加え、胆管上皮細胞の増殖も認められた。遺伝子発現解析では、TNF α が対照群と比較し、両投与期間において増加傾向を示した。

5. 新規 *in vivo* 有害性評価手法の確立と一次線毛のオルガノイド評価系への応用検討

① 新規 *in vivo* 有害性評価手法の確立：

一次線毛の形態を定量的に解析する手法を確立した。この手法を用いて、カルバミン酸エチル(10 mM)、トリクロロエチレン(760 nM)の曝露(受精後3日目から7日目まで)により、ゼブラフィッシュ脳の細胞の一次線毛が短くなることを明らかにした。

② 一次線毛のオルガノイド評価系への応用：

化学物質処理をしたマウス肝臓オルガノイドを用いて、一次線毛の発現を評価した結果、一次線毛のいわゆる“毛”に相当する軸糸に存在する α -acetylated tubulinはオルガノイドで検出できなかった。そこで一次線毛の構成成分で基部に存在する中心小体の検出を試みた。

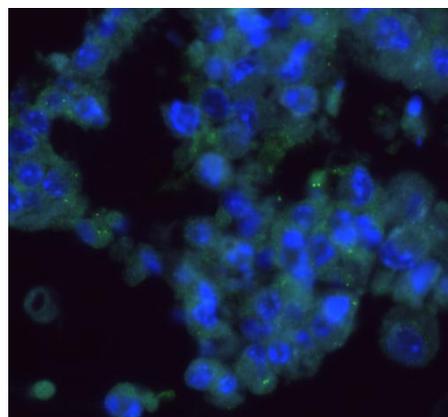


図1 コントロール(DMSO)オルガノイドの中心小体。細胞質に緑色のドット状の中心小体が1個ないし2個見られる。

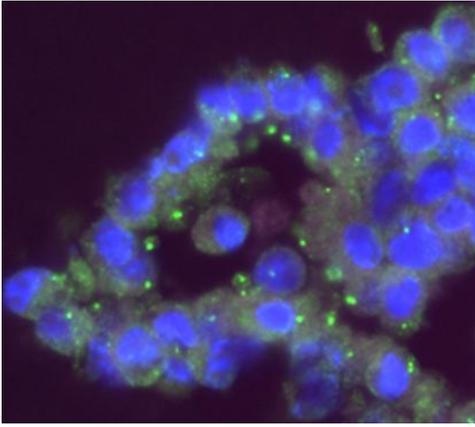


図2 フェノバルビタール (低濃度) オルガノイドの中心小体。細胞質に緑色のドット状の中心小体が1個ないし2個明瞭に見られる。

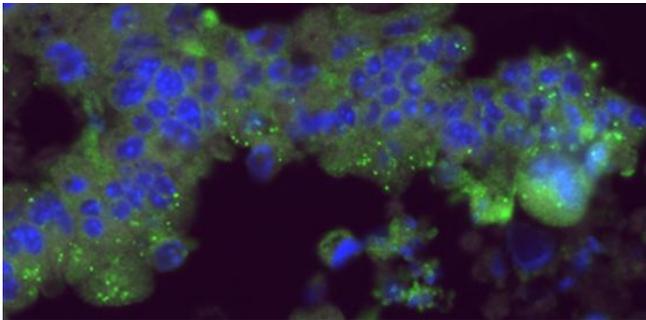


図3 フェノバルビタール (高濃度) オルガノイドの中心小体。細胞質に緑色の微細ドット状の中心小体が複数見られる細胞がある。

中心小体の変化が最も顕著に見られたのはフェノバルビタール処理オルガノイドであった。特に高濃度フェノバルビタール処理では、細胞内に中心小体が過剰に増幅しているのが認められた (図1, 2, 3)。他の化合物処理では中心小体の細胞内局在の変化が、細胞の変性などによる影響を除外できなかった。

Polo-like kinase 4 (PLK4) は中心小体複製の主要な調節因子であり、腫瘍での過剰発現が報告されている。また *in vitro* では PLK4 の過剰発現が中心体の過剰複製を引き起こすことが知られているため、中心小体と PLK4 の共発現を各化合物処理オルガノイドで検討した。中心小体と PLK4 共局在は観察されず、各オルガノイドは中心小体が複製される時期の細胞ではないことが示唆された。

D. 考察

1. マウスオルガノイドの化学物質暴露

① マウス肝臓オルガノイドの安定性評価

マウス肝臓オルガノイドの安定性評価に係るマーカー遺伝子発現解析では、成熟肝細胞マーカー (*Alb*, *Cyp3a11*) や肝細胞マーカー (*Hnf4a*) の発現において、播種後に変動が認められたが、マウス肝組織のそれら遺伝子発現と比較すると、非常に低いものであり (data not shown)、これらの遺伝子の発現の変動は

オルガノイドの安定性に影響をおよぼさない程度であると考えられる。図2は内部標準遺伝子に *18S rRNA* を用いて解析したが、*gapdh* を内部標準遺伝子を用いて解析を行った際も同様の結果であることを確認している (data not shown)。また、本研究ではオルガノイド播種後、3週間培養を行ったが、これは3回曝露実験を行う際に必要な期間である。そして、この期間においてオルガノイドの形態学的変化ならびに大きな遺伝子発現変化がみられなかったことから、本試験で用いるマウス肝臓由来オルガノイドは、同一プロトコルを用いて培養する限り、曝露実験期間を通して肝前駆オルガノイドとして安定であると考えられる。

② 細胞毒性試験

初年度に確立したプロトコルで、被験物質に、PB, EC, MCT, CMR, APAPを用いて化学物質単回曝露実験を行った結果、濃度依存的に細胞生存率の低下が確認され、小核試験ならびに *ec*-NGS解析に使用する被験物質の曝露濃度の決定を行うことができた。また、確立したプロトコルの妥当性も確認できた。

③ 小核試験

化学物質曝露後に小核出現頻度をコントロールと比較したところ、遺伝毒性発がん物質および肝毒性物質では上昇したが、非遺伝毒性発がん物質ではコントロールと同程度であった。この結果から、オルガノイドを用いて小核を指標に化学物質の遺伝毒性評価が可能であること、肝毒性物質も評価できることが示唆された。また、本試験では出現する小核の大きさに違いがあることが確認できた (図8)。大きい小核は、紡錘糸異常により生じる異数性異常由来、小さい小核は DNA 損傷により生じる構造異常由来とされており、小核形成のメカニズムが異なることを意味する。小核の出現頻度に加え、小核の大きさも考慮することで、遺伝毒性メカニズムを明らかにできる可能性がある。

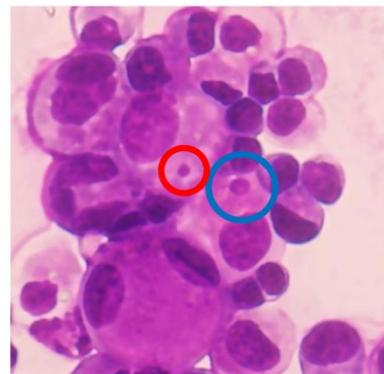


図8. MCT曝露により観察された大きさに違いのある小核。青○：大きい小核、赤○：小さい小核

③ Error-Corrected NGS によるゲノム変異解析

小核試験で小核出現頻度が高かった MCT について *ec*-NGS によりゲノム変異の解析を実施した。その結果、コントロールと比較し、曝露により1塩基置換変異頻度が上昇することがわかった。MCTは肝発がん性を示す遺伝毒性発がん物質であるが、Ames試験では陰性となることが知られている。一方、マウス肝臓由来のオルガノイドを用いた本研究では、MCTの変異原性を陽性と捉えることができた。そのメカニズムにつ

いてはまだ詳細な検討をしていないが、おそらく、我々のアクリルアミドの先行研究で報告したものと同様に、MCTの代謝活性化に係る酵素がオルガノイドで誘導されたものと推測している。MCTはCYPにより代謝活性化され、dGのDNA付加体(DHP-dG)の生成を介してゲノム変異を誘発すると考えられている。事実、本研究で解析したMCTの変異シグネチャーパターンからもC:G to A:Tの変異がコントロールと比べて増加していることから、マウスオルガノイドにおいてもこれらMCTのDNA付加体を介してゲノム変異を誘発することが示唆された。Ec-NGSでは変異を持つ細胞の表現型によらず、網羅的かつノンバイアスな変異解析が可能であることから、従来の標的遺伝子上に起こる変異原性評価手法よりも優れていると考えられる。今回は、1塩基置換のみの解析結果を報告したが、得られたゲノム情報からは2塩基置換やある程度大きな挿入・欠失変異についても検出が可能であることから、従来の変異原性評価法と比べ、得られる情報も多く、多面的な変異原性評価が可能になると考えられる。さらに、ec-NGSでは変異頻度による定量性のみならず、得られる変異パターン(変異シグネチャー)が変異導入の要因と紐づいていることから、これらの情報を用いることで、遺伝毒性メカニズムの推測も可能となる。本研究では、このような新規かつ革新的な変異解析手法を動物試験代替法としてのオルガノイドに応用可能であることが示すことができ、その意義は大きいと考える。

2. マウスオルガノイドを用いた毒性評価と遺伝子発現解析

本研究では、マウス肝臓オルガノイドに対して肝発がん物質あるいは非肝発がん物質の添加による影響について、網羅的遺伝子発現解析による比較解析を行うことで、*in vivo*マウス急性毒性試験の代替法となり得るかについて検討を行っている。昨年度までにマウス肝臓オルガノイドに被験物質を投与した際に、肝発がん物質特異的にHepatic Steatosisなどの炎症に起因する疾患の機能が亢進している事が明らかとなっている。本年度は、*in vivo*マウス4週間ばく露肝臓を用いて比較検討を行った結果、P450を介した代謝や異物代謝誘導系、グルタチオン抱合の亢進などが共通してみられた。特に、PBばく露マウス肝臓と肝臓オルガノイドの比較では、肝傷害やそれらに伴う再生の亢進が、*in vitro*および*in vivo*の双方で共通して発現変動することが確認できた一方で、CMR投与においては共通して発現変動を示すシグナルはみられなかった。しかしながら、CMR投与において*in vitro*において活性化が示されたNecrosis of liverが*in vivo*では不活性化を示していることから、肝臓オルガノイドにおけるNecrosis of liverの活性化に伴う炎症誘導について、今後マウス組織由来オルガノイドおよび免疫/間質細胞との共培養系を用いることで、例えば肝細胞と肝星細胞との相関や肝細胞とクッパー細胞との相関など、より生体を模倣した影響が評価できると期待される。

3. マウスオルガノイドを用いたエピゲノム変化評価系の構築

PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓(*in vivo*)のメチル変化の比較では共通する1塩基レベルの変化部位、また変化領域はなかった。*in vivo*試験の高用量のうちの1検体のみが他と異なるメチル化状態を示していたため、その結果が影響した可能性を考え、1検体を除いての解析を行ったが、同様に共通したメチル化変化はなかった。組織学的な観察においては、この1検体においても他の高用量の検体と同様に全体的に肝細胞の肥大が見られているとのことで、単純にこの1検体の部分的なサンプリングされた細胞の違いがメチル化の違いに影響したということではないと思われるため、エピゲノムを解析するタイムポイントなど、検討が必要と思われる。*in vitro*、*in vivo*試験の両者において、顕著なメチル化変化が検出されておらず、暴露方法の検討、他の化学物質での検討が必要と考えられる。例えば、オルガノイドのPB処置後の解析においても、今回3回暴露24時間後といった比較的早い段階で解析を行っており、継代を重ねた後など、何らかの細胞が濃縮される可能性が高くなった後には特定のメチル化変化が濃縮され検出されるということがあるかもしれない。

4. In vivo毒性試験

1-1) CMRを用いた検討

CMRは、シナモンなど多くの植物に含まれる芳香物質であるが、過剰摂取により肝障害を引き起こすとの報告もある。本分担研究では、マウスにCMRを短期間反復投与することにより生じる肝臓への影響について解析した。その結果、本実験条件において、4週間投与では明らかな組織学的変化は見られなかったが、肝細胞への分化の指標となる遺伝子発現に影響が見られた。一方、13週間投与では組織学的に明らかな肝障害が認められたが、Sox9を除き上記の遺伝子発現に明らかな変化は見られなかった。

1-2) MCTを用いた検討

MCTは、マウスやラットに投与することにより肺高血圧症を誘発することが知られている。肝臓の血流が障害されることで低酸素血症が生じ、肺高血圧症が誘発されるとされている。本分担研究では、マウスにMCTを2ないし4週間間歇的に反復投与することにより肝臓への影響を解析した。その結果、本実験条件において、MCTによる明らかな肝傷害は認められなかった。しかし、2核肝細胞並びにPCNA陽性肝細胞は増加傾向を示し、さらに、胆管増生を示唆する変化も認められ、MCT反復投与による肝臓への影響が見出された。これより、

両化合物のマウスへの反復投与により、いずれも異なる肝毒性プロファイルを示す結果が得られた。これは今後の*in vitro*毒性評価系の構築において、新たな評価指標の確立するための研究支援材料が得られたものと考えられた。

5. 新規*in vivo*有害性評価手法の確立と一次線毛のオルガノイド評価系への応用検討

生体の肝臓では少数ながら一次線毛は観察され、肝障害時の再生に一次線毛陽性の前駆細胞が関与する

(Journal of Hepatology 2013 vol. 60, 143-151)。今回用いた各化合物処理のオルガノイドでは完成された一次線毛は観察されなかったが、生体とは異なる環境条件によるものと考えられる。

一次線毛の軸糸が伸びる基部に相当する中心小体はオルガノイドの細胞にも発現しており、フェノバルビタール高濃度処理では中心小体の増加が認められた。中心体の過剰複製は染色体不安定化を誘発し、がん化の初期課程に関与する。その機序としては細胞周期の停止や延長による中心体複製の制御破綻があるとされている (BMB Rep. 2023; 56, 216-224)。従って、フェノバルビタールの有害性評価の一つとして、中心小体の数的過剰が指標になりうるものと考えられる。その他の化合物で明瞭な中心小体の過剰が観察されなかったのは、細胞の変性などが影響し、中心小体検出の至適条件ではなかった可能性が考えられる。今後は各化合物で中心小体が検出される至適条件の検討、また濃度依存性の有無などを検証する必要があると考えられる。

また、本研究で確立した一次線毛の定量的解析手法を用いて、カルバミン酸エチルやトリクロロエチレンの曝露による胆管上皮細胞の一次線毛形態を評価可能と考えられる。

E. 結論

2施設でマウス肝臓オルガノイドの安定性について、各種遺伝子発現を指標に解析した結果、両施設ともに遺伝子発現の大きな変化は認められず、初年度に確立したプロトコルを用いて培養した際は肝前駆オルガノイドとして安定であると判断した。細胞毒性試験において、マウス肝臓オルガノイドに化学物質 (PB, EC, MCT, CMR, APAP) を曝露すると濃度依存的に細胞生存率が低下した。小核試験においては、遺伝毒性発がん物質 (EC, MCT, CMR) および肝毒性物質である APAP では小核出現頻度がコントロールと比較して上昇したが、非遺伝毒性発がん物質である PB 曝露ではコントロールと比較して同程度であったことから、マウス肝臓オルガノイドを用いた小核を指標とする化学物質の遺伝毒性評価の妥当性が確認できた。さらに ec-NGS 解析では、化学物質曝露により変異頻度の上昇と変異シグネチャーパターンの変化が認められた。同手法は、変異を持つ細胞の表現型によらず、網羅的かつノンバイアスな変異解析が可能であることから、従来の標的遺伝子上に起こる変異原性評価手法よりも優れていると考えられる。また、得られるゲノム情報からは1塩基置換のみならず、2塩基置換やある程度大きな挿入・欠失変異についても検出が可能であることから、従来の変異原性評価法と比べ、得られる情報も多く、多面的な変異原性評価が可能になると考えられる。さらに、得られる変異パターン (変異シグネチャー) が変異導入の要因と紐づいていることから、これらの情報を用いることで、遺伝毒性メカニズムの推測も可能となる。このような新規かつ革新的な変異解析手法を動物試験代替法としてのオルガノイドに応用可能であることが示せた意義は大きいと

考える。

本研究により、化学物質にばく露したマウス肝臓オルガノイドにおいて、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、in vivo マウス肝臓と同様に炎症関連シグナルの誘導や Hepatic steatosis の亢進が観察できることが示唆された。また、マウス肝臓オルガノイドにおける化学物質ばく露による影響が弱いことが予想される場合には、マウス肝臓オルガノイドに加えて免疫/間質細胞共培養系を実施することで、炎症応答による再生の誘導などが観察できると期待される。

PB 処置による肝臓由来オルガノイド (in vitro) と肝臓 (in vivo) のメチル変化の比較では共通する1塩基レベルの変化部位、また変化領域は同定されなかった。メチル化を指標とする in vitro 有害性評価手法の確立において、暴露方法、共培養の活用などさらなる条件検討が必要と考えられた。

本分担研究では、肝毒性が報告されている陽性対照物質を実際にマウスに投与することにより標的臓器である肝臓において、種々の毒性パターンを有する病態が得られた。本成果は、オルガノイド培養による in vitro 毒性評価系における新たな毒性指標の妥当性を検証していく上で重要な役割を担う結果となり得るものと考えられた。

一次線毛の構造体である中心小体はフェノバルビタール処理により過剰複製された。このことは染色体不安定化を誘発してがん化に関与するため、有害性評価の指標になりうるものが示唆された。さらに、本研究で確立した一次線毛の定量的解析手法を用いて、化学物質の曝露による一次線毛の形態変化を様々な細胞において評価することができる。

F. 健康危険情報

特になし

研究発表

1. 論文発表

1. Hasegawa S, Shoji Y, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Mimaki S, Tsuchihara T, Totsuka Y. Whole genome sequencing analysis of model organisms elucidates the association between environmental factors and human cancer development. *Int J Mol Sci.* 25:36, 2024.
2. Watanabe K, Komiya M, Obikane A, Miyazaki T, Ishino K, Ikegami K, Hashizume H, Ishitsuka Y, Fukui T, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Totsuka Y. Development of a genotoxicity/carcinogenicity assessment method by DNA adductome analysis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 899:503821, 2024.
3. Imai T, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, Totsuka Y. Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems. *J Toxicol Sci.* 49(10):425-434, 2024.
4. Vachiraarunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, Kakehashi A, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and

their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. Arch Toxicol. 98:2065–2084, 2024.

5. Gi M, Suzuki S, Kanki M, Yokohira M, Tsukamoto T, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Qiu G, Guo R, Wanibuchi H. A novel support vector machine-based 1-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. Arch Toxicol. 98:2711–2730, 2024.
6. Suzuki S, Gi M, Kobayashi T, Miyoshi N, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Suemizu H, Wanibuchi H. Urinary bladder carcinogenic potential of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) in humanized-liver mice. Toxicol Sci. 202:210–219, 2024.
7. Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. J Toxicol Pathol. 38:59–67, 2025.
8. Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product PloomTECH+ and 3R4F reference cigarettes. J Toxicol Pathol. 38:147–154, 2025.
9. Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. J Toxicol Pathol. 38:161–165, 2025.
10. Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S. Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. Fundam Toxicol Sci. 11(1):37–56, 2024.
11. Kanayama K, Imai H, Hashizume R, Matsuda C, Usugi E, Hirokawa Y, Watanabe M. Extrachromosomal DNA dynamics contribute to intratumoural receptor tyrosine kinase genetic heterogeneity and drug resistance in gastric cancer. Mol Cancer Res. [Epub ahead of print], 2025. doi:10.1158/1541-7786.MCR-24-0741.
12. 西村 有平, 一次繊毛を介した脂肪前駆細胞・間葉系前駆細胞の機能制御, 日本薬理学雑誌 159 巻 4 号

2. 学会発表

1. 戸塚ゆかり, DNA 付加体研究の過去・現在・未来 東京、令和 6 年日本環境変異原ゲノム学会公開シンポジウム、2024 年 6 月 1 日
2. Yukari Totsuka, New Horizons Of DNA Adductome For Exploring Environmental Causes Of Cancer, 札幌、第 42 回札幌国際がんシンポジウム、2024 年 6 月 6–8 日
3. Yukari Totsuka, Landscape of mutational signatures observed in laboratory animal tumors induced by various carcinogens, The 8th JCA-AACR Special Joint Conference, 京

都、2024 年 6 月 28–30 日

4. 大橋 清佳、梶川 明音、前川 竜也、煙山 紀子、戸塚ゆかり、美谷島克宏、カルバミン酸エチル（ウレタン）のマウス反復投与毒性試験における病態解析、第 51 回日本毒性学会学術年会（2024 年 7 月、福岡）
5. 戸塚ゆかり、小宮雅美、煙山紀子、加藤 護、Genotoxicity induced in mice lungs by inhalation exposure to heated tobacco products、第 83 回日本癌学会総会、福岡、2024 年 9 月 19–21 日
7. 戸塚ゆかり、DNA 付加体の網羅的解析を用いた発がん要因およびメカニズムの解明、アンチエイジング研究シンポジウム、東京、2024 年 10 月 25–26 日
8. 戸塚ゆかり、環境要因による DNA 付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索、Web 開催、環境エピゲノミクス研究会 (EEG) 2024 春季ネットシンポジウム、2024 年 11 月 9 日
9. 戸塚ゆかり、DNA 付加体解析を基軸とした発がん要因およびメカニズムの解明、福岡、第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 27–29 日
10. 戸塚ゆかり、オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発 第 85 回 MMS 秋の定例会、岡山、2024 年 12 月 6 日
11. 戸塚ゆかり、石ケ守里加子、牛山 明、稲葉洋平、美谷島克宏、煙山紀子、加熱タバコ製品の吸入曝露によりマウス肺に誘導される遺伝毒性、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7–8 日
12. 戸塚ゆかり、永井桃子、加藤 護、次世代シーケンサーにより環境要因とヒト発がんの関係を解明する、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7–8 日
13. 石ケ守里加子、今井正彦、大野彰子、戸塚ゆかり、マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの毒性評価、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7–8 日
14. 長谷川晋也、Asmaa Elzawahry、永井桃子、加藤 護、魏 民、鈴木周五、鰐淵英機、松田知成、戸塚 ゆかり、N-ニトロソ胆汁酸抱合体の変異シグネチャーの解析、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7–8 日
15. 渡部 浩平、三好 規之、戸塚ゆかり、二環芳香族アミンにおける変異スペクトル解析、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7–8 日
16. 宮崎 飛翔、藤岡 正喜、鰐淵 英機、美谷島 克宏、石ケ守 里加子、加藤 孝一、戸塚 ゆかり、日本薬学会第 145 年会、2025 年 3 月 27–29 日
17. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、ワチラアルンウオン アルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐淵英機。遺伝毒性肝発がん物質の超短期検出モデルの確立。第97回日本産業衛生学会、広島（2024年5月22-25日）
18. 鈴木周五、藤岡正喜、魏民、アルパマス ワチラアルンウオン、梯アンナ、鰐淵英機。ジメチ

- ルアルシン酸経胎盤ばく露肝発がんにおける脂質代謝異常の関与. 第20回日本病理学会カンファレンス、山形 (2024年6月26-27日)
19. Masaki Fujioka, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Shugo Suzuki, Hideki Wanibuchi. Development of an *in vitro* Assay for Dose Selection in Trans-Tracheal Intrapulmonary Spraying Administration in Rat. 第51回日本毒理学学会学術年会、福岡 (2024年7月3-5日)
 20. Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. ヒト化肝臓マウスモデルを用いたヒ素の代謝および毒性の評価. 第37回発癌病理研究会、鳥取 (2024年8月20-22日)
 21. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露によるF1マウスにおける肝発がん機序にはDNAメチル化異常が関与する. 2024年度文部科学省学術変革領域研究【先端モデル動物支援プラットフォーム】若手支援技術講習会、愛知 (2024年8月29-31日)
 22. 梯アンナ、西土井悠作、邱桂鈺、鈴木周五、野浦郁恵、アルパマス、ワチラルンウオン、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカーとしてPRDX3の検討. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
 23. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、Vachiraarunwong Arpamas、大石裕司、邱桂鈺、Praseatsook Kwanchanok、郭潤傑、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の交配前期、交配期、妊娠期および授乳期ばく露による仔ラットに対する発がん性の検討. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
 24. Arpamas Vachiraarunwong, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Evaluation of the Hepatocarcinogenic Potential of Dimethylarsinic Acid in Humanized-Liver Mice. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
 25. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、梯アンナ、鰐淵英機. *o*-Toluidine誘発ラット膀胱増殖性病変に対するNADPH酸化酵素阻害剤apocyninの抑制効果. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
 26. Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Role of Oncomodulin in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced Rat Bladder Carcinogenesis. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
 27. 邱桂鈺、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Vachiraarunwong Arpamas、郭潤傑、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質の超短期検出モデルの確立. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
 28. 藤岡正喜、Vachiraarunwong Arpamas、邱桂鈺、郭潤傑、鈴木周五、鰐淵英機、魏民. 化学物質のラット経気管肺内噴霧投与法の *in vitro* 投与量設定法の開発. 第51回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、東京 (2024年12月20日11月8-9日)
 29. 邱桂鈺、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、ワチラルンウオン、アルパマス、野浦郁恵、郭潤傑、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露によるF1ラット海馬神経新生に及ぼす影響. 第29回ヒ素シンポジウム、徳島 (2024年12月7-8日)
 30. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、ワチラルンウオン、アルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の経胎盤ばく露によるF1マウス肝発がん機序におけるDNAメチル化異常の関与. 第29回ヒ素シンポジウム、徳島 (2024年12月7-8日)
 31. 梯アンナ、鈴木周五、西土井悠作、邱桂鈺、Vachiraarunwong Arpamas、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌における新規マーカーとしての3の解析及び発がん機序解明. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日)
 32. Guiyu Qiu, Min Gi, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Anna Kakehashi, Arpamas Vachiraarunwong, Ikue Noura, Runjie Guo, Hideki Wanibuchi. A novel support vector machine-based one-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日) ワークショップ
 33. Masaki Fujioka, Min Gi, Shugo Suzuki, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Yuji Oishi, Hideki Wanibuchi. Lack of carcinogenicity of diphenylarsinic acid in F1 rats following maternal exposure from pre-mating to Lactation. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日)
 34. Arpamas Vachiraarunwong, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Runjie Guo, Shugo Suzuki, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Hepatotoxicity of per-and polyfluoroalkyl substances on immortalized human hepatocytes. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日)
 35. Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Oncomodulin is a novel early marker of urinary bladder carcinogenesis in rats. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日)
 36. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、梯アンナ、鰐淵英機. ヒト化肝臓マウスを用いた4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)のヒト化肝細胞での代謝と膀胱発がん性の検証. 2024年度文部科学省学術変革領域研究学術研究支援基盤形成先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会、滋賀 (2025年2

- 月12-13日)
37. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊 「患者由来オルガノイド利用した個別化医療に対応した薬剤耐性原因遺伝子の探索」第83回日本癌学会、一般口頭発表, 2024. (福岡)
 38. 大橋 清佳、田中 あかり、竹田 結菜、神野 涼平、煙山 紀子、笹瀬 智彦、前川 竜也、美谷島 克宏. クマリンの反復投与毒性試験におけるマウス肝臓の病態解析, 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2025.1.31)
 39. Yuhei Nishimura, Exploration of therapeutic agents targeting trichoplein-mediated ciliogenesis, Anatomy-Physiology-Pharmacology Week in 2025 (APPW2025) March 17. 2025

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立
(22KD1001)

ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発

研究代表者 戸塚 ゆ加里 星薬科大学 教授

研究要旨

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、実験動物を用いた反復投与試験等の結果が重視されることが多い。一方、動物愛護3R(Replacement・Reduction・Refinement)の観点から、化学物質の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。そこで、オルガノイドを用いて、化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価方法の開発を目指した。

まず、オルガノイドの安定性について2施設で同一プロトコールにより培養したオルガノイドについて、各種遺伝子発現（前駆肝細胞 (*Sox9*)、肝細胞 (*Hnf4a*, *Ttr*)、胆管細胞 (*Krt19*)、成熟肝細胞 (*Alb*, *Cyp*)) を指標に評価を行った。その結果、両施設ともに遺伝子発現の大きな変化は認められず、同一プロトコールを用いて試験を実施する限りは肝前駆オルガノイドとして安定であると判断した。そして、化学物質の曝露実験では、マウス肝臓オルガノイドにフェノバルビタール(PB)、カルバミン酸エチル(EC)、モノクロタリン(MCT)、クマリン(CMR)、アセトアミノフェン(APAP)を曝露したところ、濃度依存的に細胞生存率の低下が確認できた。また遺伝毒性試験として小核試験を行った結果、遺伝毒性発がん物質曝露(EC, CMR, MCT)および肝毒性物質であるAPAP曝露では小核出現頻度がコントロールと比較して上昇したが、非遺伝毒性発がん物質であるPB曝露ではコントロールと比較して同程度であったことから、マウス肝臓オルガノイドを用いた小核を指標とする化学物質の遺伝毒性評価の妥当性が確認できた。さらにError-Corrected NGS(ec-NGS)解析では、MCT曝露により変異頻度の上昇と変異シグネチャーパターンの変化が認められた。MCTはAmes試験では陰性と判定される遺伝毒性肝発がん物質であることから、マウス正常肝組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法は動物実験代替法として有用であることが示すことができた意義は大きいと考える。

A. 研究目的

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護3R(Replacement・Reduction・Refinement)の観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。しかしながら、現在汎用されている *in vitro* 毒性試験はいずれも均質な細胞を用いての評価系であり、生体への外挿の点で限界があるため、その限界を突破するイノベーションが期待されている。

近年、3次元オルガノイド培養法の発展により様々な組織由来の正常細胞を長期培養することが可能となってきた。オルガノイドは *in vitro* 系で幹細胞から作ることができミニチュアの臓器とも言われており、幹細胞がもつ自己複製能と分化能を利用し自己組織化させることで臓器あるいは器官に特異的な3次元構造を形成し、その機能を再現することが可能である。このことから発生生物学、疾患病理学、細胞生物学、再生メカニズムといった基礎研究や創薬研究など多岐にわたる研究分野で使用されている。

申請者はこれまでに、レポーター遺伝子導入マウス由来のオルガノイドを用いて遺伝毒性試験を実施した結果、細菌や哺乳類細胞を用いる既存の試験法では検出できず、*in vivo* モデルでのみ検出できる化学物質の点突然変異をオルガノイドでは陽性と判定できることを明らかにした (Komiya M, Totsuka Yら, 2021)。

本研究では、オルガノイドを用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法を確立するため、各施設で共通して使用する予定である市販のマウス肝臓由来オルガノイド(STEMCELL Technologies, ST-70932)及び既知の遺伝毒性化学物質、非遺伝毒性化学物質、肝毒性物質を用いて、①マウス肝臓オルガノイドの安定性評価、②細胞毒性試験、③小核試験、④Error-Corrected NGS(ec-NGS)によるゲノム変異解析について実施した。

B. 研究方法

⑤ マウス肝臓オルガノイドの安定性評価

本研究では標準的な毒性試験法の開発を目指していることから、オルガノイドの品質が安定であることが望ましい。しかしながら、オルガノイドは培養条件などにより遺伝子発現に影響することが知られていることから、使用前にその品質について確認する必要があると考えた。そこで、2施設間（星薬科大学と国立がん研究センター）で同一の実験プロトコールに従い培養したオルガノイドの安定性について、各種遺伝子を分子マーカーとして評価した。

凍結日と継代数が異なる凍結マウス肝臓由来オルガノイド(2本)を各々ドーム型培養で播種し、1週間ごとに3週間継代を行った。播種ならびに継代時に形態学的観察を行い、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析のためオルガノイドを回収した。遺伝子発現解析の対象として、肝細胞マーカー(*Hnf4a*, *Ttr*)、前駆肝細胞マーカー(*Sox9*)、成熟肝細胞マーカー(*Alb*, *Cyp3a11*)、胆管マ

一カー (*Krt19*) の遺伝子発現量を播種時の発現量と比較して評価した。なお、内部標準遺伝子は *18S rRNA* を用いた。また、同じマーカー遺伝子を用いてマウス肝組織における遺伝子発現との比較も行った。

⑥ 細胞毒性試験

オルガノイドを播種後2時間培養し、S9mix存在下で被験物質として、フェノバルビタール(PB, 236, 472, 943 μ M)、カルバミン酸エチル(EC, 25, 50, 100 mM)、モノクロタリン(MCT, 125, 250, 500 μ M)、クマリン(CMR, 50, 100, 200 μ M)、アセトアミノフェン(APAP, 10, 20, 40 mM)を24時間曝露し洗浄後、トリプシンを用いてシングルセルにして、トリパンブルー色素排除法を用いて評価を行った。

⑦ 小核試験

オルガノイドを播種後3日間培養し、S9mix存在下被験物質として、PB(236, 943 μ M)、EC(25, 100 mM)、MCT(125, 500 μ M)、CMR(50, 200 μ M)、APAP(10, 40 mM)を24時間曝露し洗浄後、新しい培地で2日間培養し、シングルセルにして細胞を回収した。回収した細胞はサイトスピニングによりスライドガラスに固定後、ギムザ染色を行った。評価は、光学顕微鏡下で各スライドにつき2,000個の細胞を観察し、小核を保有する細胞数を計測し、算出した小核保有細胞の頻度(小核出現頻度)を指標に行った。

⑧ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析

マウス肝臓オルガノイドにS9mix存在下で、MCTの3回曝露実験を行った。播種後3日間培養したオルガノイドへ1回目の曝露(24時間)を行い、洗浄した後に新しい培地を添加した。3日間培養した後、オルガノイドを回収し再播種を行った。3日後、2回目の曝露(24時間)を行い、洗浄後に新しい培地を添加した。6日間培養後、3回目の曝露(24時間)を行い洗浄した後、TrypLEを用いてオルガノイドを回収した。なお、化学物質の培地中最終濃度は125, 500 μ Mとした。回収したオルガノイドよりAllPrep DNA/RNA Kit(QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出し、ec-NGS(Nano-Seq)解析を行った。

C. 研究結果

③ マウス肝臓オルガノイドの安定性評価

オルガノイドをドーム型培養法により培養し、継代時に形態学的変化を観察した結果、図1のように播種後3週間におけるオルガノイドの形態学的変化は認められなかった。

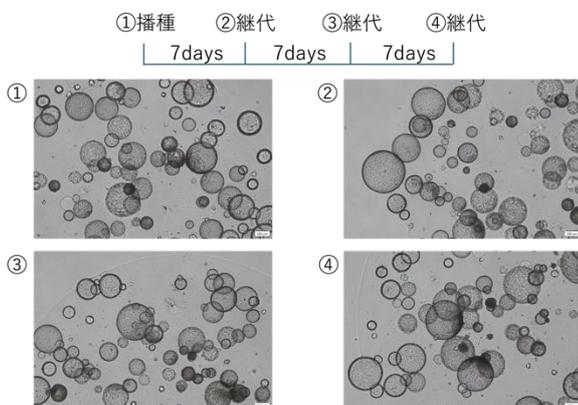


図1. オルガノイドの形態学的変化

オルガノイドの各種マーカー遺伝子発現は、同一プロトコルを用い、2施設で培養したオルガノイドにおける播種時と継代時で相対比較した。その結果、図2に示すように両施設において、*Sox9*(前駆肝細胞マーカー)、*Krt19*(胆管マーカー)、*Ttr*(肝細胞マーカー)は、継代を繰り返しても両施設間で大きな増減は認められなかった。一方、*Alb*(成熟肝細胞マーカー)、*Hnf4a*(肝細胞マーカー)および*Cyp3a11*(成熟肝細胞マーカー)に関しては、両施設ともに播種時と比較し、継代ごとにやや変動が認められた。

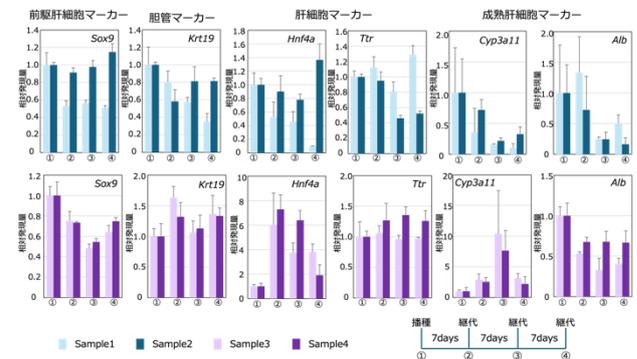


図2. 未分化オルガノイドの遺伝子発現 (上段: 星薬科大学, 下段: 国立がん研究センター)

⑤ 細胞毒性試験

化学物質を曝露させた結果、図3に示すように各化合物とも濃度依存的に細胞生存率が減少した。

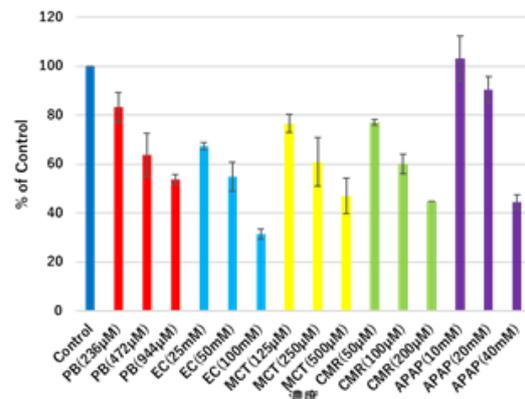
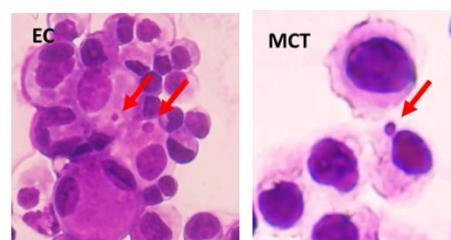


図3. 化学物質曝露による細胞毒性試験

⑥ 小核試験

化学物質を曝露させた結果、図4に示すような小核が出現し、小核出現頻度は、遺伝毒性発がん物質(EC, MCT, CMR)および肝毒性物質であるAPAPでは曝露により上昇していた(図5)。APAPは、細胞毒性が見られなかった低濃度曝露では小核発生頻度に大きな上昇は見られなかったが、細胞毒性が強く示された高濃度曝露では小核発生頻度が上昇し、細胞毒性と小核発生頻度の相関が認められた。なお、非遺伝毒性肝発がん物質であるPBはコントロールとほぼ同程度の小核出現頻度であった。



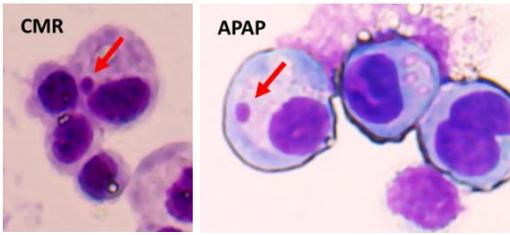


図4. 化学物質曝露による出現した小核

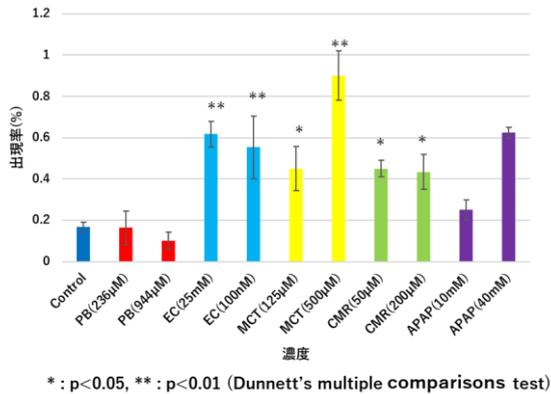


図5. 小核試験

⑦ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析
 小核試験で小核出現頻度が高かった MCT について ec-NGS によりゲノム変異の解析を実施した。その際の 1 塩基置換変異頻度を図 6 に示す。コントロール (DMS0) と比較して MCT を曝露することで変異頻度が上昇した。図 7 はゲノム変異データから変異シグネチャー解析を実施した結果を示す。コントロールのパターンと比較すると、C>A において変異シグネチャーパターンが異なることが認められた。

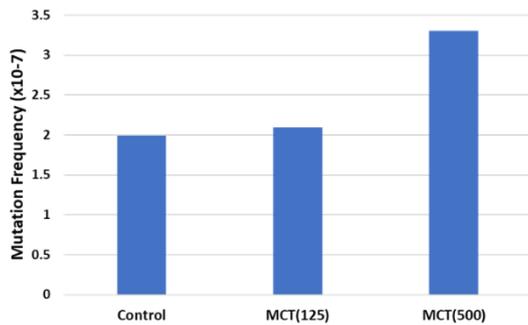


図 6. 1 塩基置換変異頻度

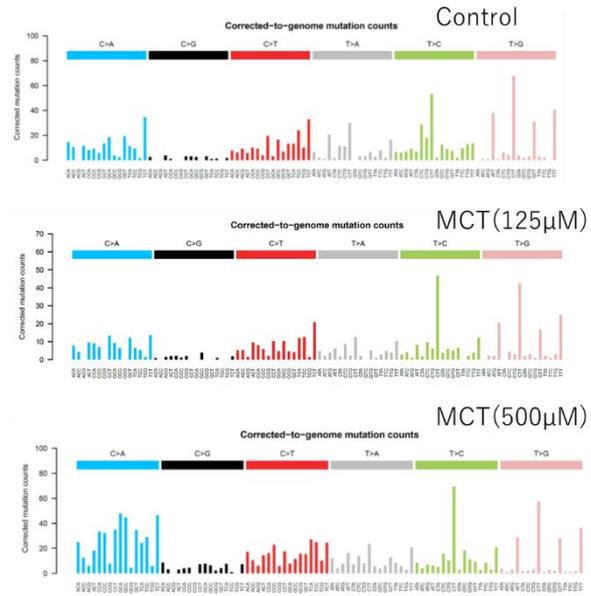


図 7. Error-Corrected NGS (Nano-Seq) による変異シグネチャーパターン

D. 考察

- ② マウス肝臓オルガノイドの安定性評価
 マウス肝臓オルガノイドの安定性評価に係るマーカー遺伝子発現解析では、成熟肝細胞マーカー (*Alb*, *Cyp3a11*) や肝細胞マーカー (*Hnf4a*) の発現において、播種後に変動が認められたが、マウス肝組織のそれら遺伝子発現と比較すると、非常に低いものであり (data not shown)、これらの遺伝子の発現の変動はオルガノイドの安定性に影響をおよぼさない程度であると考えられる。図2は内部標準遺伝子に *18S rRNA* を用いて解析したが、*gapdh* を内部標準遺伝子を用いて解析を行った際も同様の結果であることを確認している (data not shown)。また、本研究ではオルガノイド播種後、3週間培養を行ったが、これは3回曝露実験を行う際に必要な期間である。そして、この期間においてオルガノイドの形態学的変化ならびに大きな遺伝子発現変化がみられなかったことから、本試験で用いるマウス肝臓由来オルガノイドは、同一プロトコルを用いて培養する限り、曝露実験期間を通して肝前駆オルガノイドとして安定であると考えられる。
- ④ 細胞毒性試験
 初年度に確立したプロトコルで、被験物質に、PB, EC, MCT, CMR, APAPを用いて化学物質単回曝露実験を行った結果、濃度依存的に細胞生存率の低下が確認され、小核試験ならびに ec-NGS 解析に使用する被験物質の曝露濃度の決定を行うことができた。また、確立したプロトコルの妥当性も確認できた。
- ⑤ 小核試験
 化学物質曝露後に小核出現頻度をコントロールと比較したところ、遺伝毒性発がん物質および肝毒性物質では上昇したが、非遺伝毒性発がん物質ではコントロールと同程度であった。この結果から、オルガノイドを用いて小核を指標に化学物質の遺伝毒性評価が可能であること、肝毒性物質も評価できることが示唆され

た。また、本試験では出現する小核の大きさに違いがあることが確認できた(図8)。大きい小核は、紡錘糸異常により生じる異数性異常由来、小さい小核は DNA 損傷により生じる構造異常由来とされており、小核形成のメカニズムが異なることを意味する。小核の出現頻度に加え、小核の大きさも考慮することで、遺伝毒性メカニズムを明らかにできる可能性がある。



図8. MCT曝露により観察された大きさに違いのある小核。青○：大きい小核、赤○：小さい小核

④ Error-Corrected NGS によるゲノム変異解析

小核試験で小核出現頻度が高かった MCT について ec-NGS によりゲノム変異の解析を実施した。その結果、コントロールと比較し、曝露により 1 塩基置換変異頻度が上昇することがわかった。MCT は肝発がん性を示す遺伝毒性発がん物質であるが、Ames 試験では陰性となることが知られている。一方、マウス肝臓由来のオルガノイドを用いた本研究では、MCT の変異原性を陽性と捉えることができた。そのメカニズムについてはまだ詳細な検討をしていないが、おそらく、我々のアクリルアミドの先行研究で報告したものと同様に、MCT の代謝活性化に係る酵素がオルガノイドで誘導されたものと推測している。MCT は CYP により代謝活性化され、dG の DNA 付加体 (DHP-dG) の生成を介してゲノム変異を誘発すると考えられている。事実、本研究で解析した MCT の変異シグネチャーパターンからも C:G to A:T の変異がコントロールと比べて増加していることから、マウスオルガノイドにおいてもこれら MCT の DNA 付加体を介してゲノム変異を誘発することが示唆された。Ec-NGS では変異を持つ細胞の表現型によらず、網羅的かつノンバイアスな変異解析が可能であることから、従来の標的遺伝子上に起こる変異原性評価手法よりも優れていると考えられる。今回は、1 塩基置換のみの解析結果を報告したが、得られたゲノム情報からは 2 塩基置換やある程度大きな挿入・欠失変異についても検出が可能であることから、従来の変異原性評価法と比べ、得られる情報も多く、多面的な変異原性評価が可能になると考えられる。さらに、ec-NGS では変異頻度による定量性のみならず、得られる変異パターン(変異シグネチャー)が変異導入の要因と紐づいていることから、これらの情報を用いることで、遺伝毒性メカニズムの推測も可能となる。本研究では、このような新規かつ革新的な変異解析手法を動物試験代替法としてのオルガノイドに応用可能であることが示すことができ、その意義

は大きいと考える。

E. 結論

2施設でマウス肝臓オルガノイドの安定性について、各種遺伝子発現を指標に解析した結果、両施設ともに遺伝子発現の大きな変化は認められず、初年度に確立したプロトコルを用いて培養した際は肝前駆オルガノイドとして安定であると判断した。細胞毒性試験において、マウス肝臓オルガノイドに化学物質(PB, EC, MCT, CMR, APAP)を曝露すると濃度依存的に細胞生存率が低下した。小核試験においては、遺伝毒性発がん物質(EC, MCT, CMR)および肝毒性物質であるAPAPでは小核出現頻度がコントロールと比較して上昇したが、非遺伝毒性発がん物質であるPB曝露ではコントロールと比較して同程度であったことから、マウス肝臓オルガノイドを用いた小核を指標とする化学物質の遺伝毒性評価の妥当性が確認できた。さらにec-NGS解析では、化学物質曝露により変異頻度の上昇と変異シグネチャーパターンの変化が認められた。同手法は、変異を持つ細胞の表現型によらず、網羅的かつノンバイアスな変異解析が可能であることから、従来の標的遺伝子上に起こる変異原性評価手法よりも優れていると考えられる。また、得られるゲノム情報からは1塩基置換のみならず、2塩基置換やある程度大きな挿入・欠失変異についても検出が可能であることから、従来の変異原性評価法と比べ、得られる情報も多く、多面的な変異原性評価が可能になると考えられる。さらに、得られる変異パターン(変異シグネチャー)が変異導入の要因と紐づいていることから、これらの情報を用いることで、遺伝毒性メカニズムの推測も可能となる。このような新規かつ革新的な変異解析手法を動物試験代替法としてのオルガノイドに応用可能であることが示せた意義は大きいと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Hasegawa S, Shoji Y, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Mimaki S, Tsuchihara T, **Totsuka Y.**, Whole genome sequencing analysis of model organisms elucidates the association between environmental factors and human cancer development. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024;25(20):11191.
- Watanabe K, Komiya M, Obikane A, Miyazaki T, Ishino K, Ikegami K, Hashizume H, Ishitsuka Y, Fukui T, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, **Totsuka Y.**, Development of a genotoxicity/carcinogenicity assessment method by DNA adductome analysis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2024 Oct;899:503821.
- Imai T, Ishigamori R, **Naruse M.**, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, **Totsuka Y.** Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems. *J Toxicol Sci.* 2024;49(10):425-434.

2. 学会発表

- 戸塚ゆかり**, DNA 付加体研究の過去・現在・未来 東京、令和6年日本環境変異原ゲノム学会公開シンポジウム、2024年6月1日
- Yukari Totsuka**, New Horizons Of DNA Adductome For Exploring Environmental Causes Of Cancer, 札幌、第42回札幌国際がんシンポジウム、2024年

6月6-8日

42. Yukari Totsuka, Landscape of mutational signatures observed in laboratory animal tumors induced by various carcinogens, The 8th JCA-AACR Special Joint Conference, 京都、2024年6月28-30日
43. 大橋 清佳、梶川 明音、前川 竜也、煙山 紀子、戸塚ゆかり、美谷島克宏、カルバミン酸エチル(ウレタン)のマウス反復投与毒性試験における病態解析、第51回日本毒性学会学術年会(2024年7月、福岡)
44. 戸塚ゆかり、小宮雅美、煙山紀子、加藤 護、Genotoxicity induced in mice lungs by inhalation exposure to heated tobacco products, 第83回日本癌学会総会、福岡、2024年9月19-21日
45. 戸塚ゆかり、DNA付加体の網羅的解析を用いた発がん要因およびメカニズムの解明、アンチエイジング研究シンポジウム、東京、2024年10月25-26日
46. 戸塚ゆかり、環境要因によるDNA付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索、Web開催、環境エピゲノミクス研究会(EEG)2024春季ネットシンポジウム、2024年11月9日
47. 戸塚ゆかり、DNA付加体解析を基軸とした発がん要因およびメカニズムの解明、福岡、第47回日本分子生物学会年会、2024年11月27-29日
48. 戸塚ゆかり、オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発 第85回MMS秋の定例会、岡山、2024年12月6日
49. 戸塚ゆかり、石ヶ守里加子、牛山 明、稲葉洋平、美谷島克宏、煙山紀子、加熱タバコ製品の吸入曝露によりマウス肺に誘導される遺伝毒性、岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
50. 戸塚ゆかり、永井桃子、加藤 護、次世代シーケンサーにより環境要因とヒト発がんの関係を解明する、岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
51. 石ヶ守里加子、今井正彦、大野彰子、戸塚ゆかり、マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの毒性評価、岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
52. 長谷川晋也、Asmaa Elzawahry、永井桃子、加藤護、魏 民、鈴木周五、鰐淵英機、松田知成、戸塚ゆかり、N-ニトロソ胆汁酸抱合体の変異シグネチャーの解析、岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
53. 渡部 浩平、三好 規之、戸塚ゆかり、二環芳香族アミンにおける変異スペクトル解析、岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
54. 宮崎 飛翔、藤岡 正喜、鰐淵 英機、美谷島 克宏、石ヶ守 里加子、加藤 孝一、戸塚 ゆかり、日本薬学会第145年会、2025年3月27-29日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和6年度分担研究報告書

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立
(22KD1001)

分担研究項目：毒性評価・ゲノム発現解析

研究分担者 藤岡 正喜 大阪公立大学大学院医学研究科分子病理学 講師

研究要旨

化学物質の安全性評価には動物実験が必要とされるが、動物愛護の観点から代替法の開発が求められている。本研究では、オルガノイドを用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価方法の開発を目指した。昨年度までの研究で、マウス肝臓オルガノイドに対して既知の肝発がん物質を添加した際の遺伝子発現について網羅的に検討した結果、共通して変動がみられた Tox Functions として Hepatic steatosis 関連パスウェイの活性が予測されたことから、炎症に起因する疾患に関連する機能の亢進が示唆されている。本年度はオルガノイドで得られた知見が、マウス 4 週間および 13 週間ばく露試験で得られた遺伝子発現情報とどの程度対応するかどうか、相関解析を中心に検討を行った。その結果、マウス 4 週間および 13 週間ばく露試験においても、Hepatic steatosis 関連パスウェイの活性が予測された。さらに、炎症誘導や肝細胞の再生誘導に関連するパスウェイが肝臓オルガノイドおよびマウス肝臓の双方で変動していることが確認できた。以上の結果から、マウス肝臓オルガノイドで得られた知見は、*in vivo* 試験で得られた結果と相関することが確認できた。

A. 研究目的

マウス肝臓オルガノイドに化学物質をばく露し、その遺伝子発現変化について検討することで、化学物質の毒性の有無およびその機序について予測可能かどうか、検討を行った。

前年度までの研究で、マウス肝臓オルガノイドに対して非遺伝毒性肝発がん物質 1 種、遺伝毒性肝発がん物質 2 種および遺伝毒性非肝発がん物質 1 種の添加による影響について、網羅的遺伝子発現解析による比較解析を行った。その結果、肝発がん物質特異的に Hepatic Steatosis などの炎症に起因する疾患の機能が亢進している事が明らかになった。

令和6年度は、マウスに被験物質を投与し得られた肝臓を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ばく露マウス肝臓オルガノイドの結果と比較することで、被験物質ばく露マウス肝臓オルガノイドにおけるシグナルの変動がどの程度 *in vivo* モデルと相関するか検討を行った。

B. 研究方法

[材料と方法]

本研究で使用した被験物質について、下記に記す。

- Phenobarbital Sodium (PB) (CAS RN : 57-30-7)
- Coumarin (CMR) (CAS RN : 91-64-5)
- Acetoaminophen (APAP) (CAS RN : 103-90-2)

上記化学物質を用いて、4 週間(PB, APAP)あるいは 13 週間(CMR)マウスに投与した肝臓を東京農業大学 美谷島教授より供与いただいた。受領した肝臓より mRNA を抽出し、*in vivo* マウス肝臓 mRNA として、以降に記す解析を行った。

加えて、PB および CMR をそれぞればく露させたマウス肝臓オルガノイド由来 mRNA を星薬科大学 戸塚教授

より供与いただいた。受領した mRNA を *in vitro* マウス肝臓 mRNA として用いて以降に記す解析を行った。

[網羅的遺伝子発現解析]

回収した *in vivo* マウス肝臓由来 mRNA のうち、PB、CMR および APAP 投与群における対照群および高用量群をそれぞれ用いて(計 5 検体)、Clarion™ D Assay, Mouse (ThermoFisher)マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。Expression Console™ を用いて、数値化および正規化を行った。アルゴリズムは、SST-RMA を用いた。Annotation Level は、(Exon Level ではなく) Gene Level とした。得られた遺伝子発現パラメータを用いて Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを用いて、パスウェイ解析及び各被験物質ばく露による影響について検討を行った。

加えて、昨年度実施したマウス肝臓オルガノイドを用いたマイクロアレイおよびパスウェイ解析で得られたデータを用いて、*in vivo* および *in vitro* 双方でどのような影響がみられたか、検討を行った。

(倫理面の配慮)

該当なし

C. 研究結果

in vivo マウス肝臓 mRNA を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果(表1)、CMR投与において発現量比1.50以上の遺伝子は305、0.66以下の遺伝子は213であった。同様に、PB投与において発現量比1.50以上の遺伝子は398、0.66以下の遺伝子は302であった。またAPAP投与において発現量比1.50以上の遺伝子は341、0.66以下の遺伝子は318であった。IPAソフトウェアによるTox Functions解析の結果、3つの物質 (CMR、PBおよびAPAP) で共通して活性化が予測された機能として、Conjugation of glutat

hioneが挙げられた。これは昨年度に実施した*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおいて肝発がん物質であるCMRおよびPB, MCTの3つで共通して変動がみられた機能である。同様に、不活性化がみられた機能としてCell death of liverが挙げられた。

3つの化学物質ばく露で共通して変動がみられた遺伝子として55の遺伝子が同定され、KEGG_PATHWAY解析の結果、P450を介した代謝や異物代謝シグナル、活性酸素種(ROS)の産生に関わるシグナルに関連する遺伝子であることが明らかとなった。また3物質に共通する上流遺伝子について、Upstream regulator解析を実施した結果、NR1/3やNR1/2、AHRなどの異物代謝に関わる遺伝子の活性化が確認できた。また、肝発がん物質であるCMRおよびPBに共通する遺伝子セットについてTox Functions解析した結果、Hepatic steatosisの活性化が挙げられた。これは昨年度に実施した*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおいて肝発がん物質であるCMR、PBおよびMCTの3つで共通して変動がみられた機能と一致する結果である。

表1 網羅的遺伝子発現解析の結果

	物質名	Expression ratio (かつ Z score > 2)	遺伝子数
遺伝毒性肝発がん物質	クマリン (CMR)	1.50 以上	305
		0.66 以下	213
非遺伝毒性肝発がん物質	フェノバルビタール (PB)	1.50 以上	398
		0.66 以下	302
非遺伝毒性非肝発がん物質	アセトアミノフェン (APAP)	1.50 以上	341
		0.66 以下	318

昨年度実施した*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおける網羅的遺伝子発現解析との比較の結果、PB投与においては共通して発現変動を示すシグナルとして、Liver Regeneration, Inflammation liver, Hepatic steatosisがみられ、*in vivo*(マウス4週間ばく露)で得られた結果と*in vitro*(マウス肝臓オルガノイド)が良好に一致することが示された。一方、CMR投与においては共通して発現変動を示すシグナルはみられなかった。さらに、*in vivo*(マウス4週間ばく露)および*in vitro*(マウス肝臓オルガノイド)の両方で発現が確認できた遺伝子(PBでは30遺伝子、CMRでは31遺伝子)について相関解析を実施した結果、PBでは0.142、CMRでは0.386と弱い正の相関が得られた。加えて、PBではHepatocellular carcinoma関連シグナルに限定して相関解析を行った結果、0.516と正の相関が得られた。以上の結果から、マウス肝臓オルガノイドで得られた知見は、*in vivo*試験で得られた結果と相関することが確認できた。

D. 考察

本研究では、マウス肝臓オルガノイドに対して肝発がん物質あるいは非肝発がん物質の添加による影響について、網羅的遺伝子発現解析による比較解析を行うことで、*in vivo*マウス急性毒性試験の代替法となり得るかについて検討を行っている。昨年度までにマウス

肝臓オルガノイドに被験物質を投与した際に、肝発がん物質特異的にHepatic Steatosisなどの炎症に起因する疾患の機能が亢進している事が明らかとなっている。本年度は、*in vivo*マウス4週間ばく露肝臓を用いて比較検討を行った結果、P450を介した代謝や異物代謝誘導系、グルタチオン抱合の亢進などが共通してみられた。特に、PBばく露マウス肝臓と肝臓オルガノイドの比較では、肝傷害やそれらに伴う再生の亢進が、*in vitro*および*in vivo*の双方で共通して発現変動することが確認できた一方で、CMR投与においては共通して発現変動を示すシグナルはみられなかった。しかしながら、CMR投与において*in vitro*において活性化が示されたNecrosis of liverが*in vivo*では不活性化を示していることから、肝臓オルガノイドにおけるNecrosis of liverの活性化に伴う炎症誘導について、今後マウス組織由来オルガノイドおよび免疫/間質細胞との共培養系を用いることで、例えば肝細胞と肝星細胞との相関や肝細胞とクッパー細胞との相関など、より生体を模倣した影響が評価できると期待される。

E. 結論

本研究により、化学物質にばく露したマウス肝臓オルガノイドにおいて、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、*in vivo*マウス肝臓と同様に炎症関連シグナルの誘導やHepatic steatosisの亢進が観察できることが示唆された。また、マウス肝臓オルガノイドにおける化学物質ばく露による影響が弱いことが予想される場合には、マウス肝臓オルガノイドに加えて免疫/間質細胞共培養系を実施することで、炎症応答による再生の誘導などが観察できると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Fujioka M](#), Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. J Toxicol Pathol. 2025; 38: 161-5.
- 2) Noura I, Suzuki S, Gi M, [Fujioka M](#), Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product ploomTECH+ and 3R4F reference cigarettes. J Toxicol Pathol. 2025; 38: 147-54.
- 3) Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, [Fujioka M](#), Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. J Toxicol Pathol. 2025; 38: 59-67.
- 4) Suzuki S, Gi M, Kobayashi T, Miyoshi N, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I,

- Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Suemizu H, Wanibuchi H. Urinary bladder carcinogenic potential of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) in humanized-liver mice. *Toxicol Sci.* 2024; 202: 210-219.
- 5) Gi M, Suzuki S, Kanki M, Yokohira M, Tsukamoto T, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Qiu G, Guo R, Wanibuchi H. A novel support vector machine-based 1-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. *Arch Toxicol.* 2024; 98: 2711-2730.
 - 6) Vachiraarunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, Kakehashi A, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. *Arch Toxicol.* 2024; 98: 2065-2084.
2. 学会発表
- 1) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、ワチラアルンウオン アルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質の超短期検出モデルの確立. 第 97 回日本産業衛生学会、広島 (2024 年 5 月 22-25 日)
 - 2) 鈴木周五、藤岡正喜、魏民、アルパマス ワチラアルンウオン、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸経胎盤ばく露肝発がんにおける脂質代謝異常の関与. 第 20 回日本病理学会カンファレンス、山形 (2024 年 6 月 26-27 日)
 - 3) Masaki Fujioka, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Shugo Suzuki, Hideki Wanibuchi. Development of an *in vitro* Assay for Dose Selection in Trans-Tracheal Intrapulmonary Spraying Administration in Rat. 第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡 (2024 年 7 月 3-5 日)
 - 4) Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. ヒト化肝臓マウスモデルを用いたヒ素の代謝および毒性の評価. 第 37 回発癌病理研究会、鳥取 (2024 年 8 月 20-22 日)
 - 5) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による F1 マウスにおける肝発がん機序には DNA メチル化異常が関与する. 2024 年度文部科学省学術変革領域研究【先端モデル動物支援プラットフォーム】若手支援技術講習会、愛知 (2024 年 8 月 29-31 日)
 - 6) 梯アンナ、西土井悠作、邱桂鈺、鈴木周五、野浦郁恵、アルパマス ワチラアルンウオン、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカーとして PRDX3 の検討. 第 83 回日本癌学会学術総会、福岡 (2024 年 9 月 19-21 日)
 - 7) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、Vachiraarunwong Arpamas、大石裕司、邱桂鈺、Praseatsook Kwanchanok、郭潤傑、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の交配前期、交配期、妊娠期および授乳期ばく露による仔ラットに対する発がん性の検討. 第 83 回日本癌学会学術総会、福岡 (2024 年 9 月 19-21 日)
 - 8) Arpamas Vachiraarunwong, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Evaluation of the Hepatocarcinogenic Potential of Dimethylarsinic Acid in Humanized-Liver Mice. 第 83 回日本癌学会学術総会、福岡 (2024 年 9 月 19-21 日)
 - 9) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、梯アンナ、鰐淵英機. *o*-Toluidine 誘発ラット膀胱増殖性病変に対する NADPH 酸化酵素阻害剤 apocynin の抑制効果. 第 83 回日本癌学会学術総会、福岡 (2024 年 9 月 19-21 日)
 - 10) Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Role of Oncomodulin in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced Rat Bladder Carcinogenesis. 第 83 回日本癌学会学術総会、福岡 (2024 年 9 月 19-21 日)
 - 11) 邱桂鈺、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Vachiraarunwong Arpamas、郭潤傑、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質の超短期検出モデルの確立. 第 83 回日本癌学会学術総会、福岡 (2024 年 9 月 19-21 日)
 - 12) 藤岡正喜、Vachiraarunwong Arpamas、邱桂鈺、郭潤傑、鈴木周五、鰐淵英機、魏民. 化学物質のラット経気管肺内噴霧投与方法の *in vitro* 投与量設定法の開発. 第 51 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、東京 (2024 年 12 月 20 日 11 月 8-9 日)
 - 13) 邱桂鈺、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、ワチラアルンウオン アルパマス、野浦郁恵、郭潤傑、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露による F1 ラット海馬神経新生に及ぼす影響. 第 29 回ヒ素シンポジウム、徳島 (2024 年 12 月 7-8 日)
 - 14) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、ワチラアルンウオン アルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の経胎盤ばく露による F1 マウス肝発がん機序における DNA メチル化異常の関与. 第 29 回ヒ素シンポジウム、徳島 (2024 年 12 月 7-8 日)
 - 15) 梯アンナ、鈴木周五、西土井悠作、邱桂鈺、Vachiraarunwong Arpamas、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌における新規マーカーとしての 3 の解析及び発がん機序解明. 第 41 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025 年 1 月 30-31 日)
 - 16) Guiyu Qiu, Min Gi, Shugo Suzuki, Masaki

- Fujioka, Anna Kakehashi, Arpamas Vachiraarunwong, Ikue Noura, Runjie Guo, Hideki Wanibuchi. A novel support vector machine-based one-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡（2025年1月30-31日）ワークショップ
- 17) Masaki Fujioka, Min Gi, Shugo Suzuki, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Yuji Oishi, Hideki Wanibuchi. Lack of carcinogenicity of diphenylarsinic acid in F1 rats following maternal exposure from pre-mating to Lactation. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡（2025年1月30-31日）
- 18) Arpamas Vachiraarunwong, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Runjie Guo, Shugo Suzuki, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Hepatotoxicity of per-and polyfluoroalkyl substances on immortalized human hepatocytes. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡（2025年1月30-31日）
- 19) Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Oncomodulin is a novel early marker of urinary bladder carcinogenesis in rats. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡（2025年1月30-31日）
- 20) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、梯アンナ、鰐淵英機. ヒト化肝臓マウスを用いた 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) のヒト化肝細胞での代謝と膀胱発がん性の検証. 2024年度文部科学省学術変革領域研究学術研究支援基盤形成先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会、滋賀（2025年2月12-13日）

**G. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）**

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立
(22KD1001)

研究分担者 成瀬 美衣 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

化学物質の開発には安全性評価が不可欠であり、実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護の観点から化学物質の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。私たちはこれまでに、マウス正常組織由来のオルガノイドを用いた発がん性試験法を開発し、化学物質の安全性評価に妥当・有用であることを見出している。またメチル化解析におけるオルガノイドの有用性を示してきた。

以上の背景よりオルガノイドを用いた化学物質の新規 *in vitro* 評価手法のエピゲノム変化評価系の構築を目指す。本年度は、フェノバルビタール(PB)を3回暴露した肝臓オルガノイド(*in vitro* 試験)とPBを反復投与したマウス肝臓(*in vivo* 試験)のメチル化解析を行い、オルガノイドによる評価法の妥当性の検討のため、*in vitro* 試験と *in vivo* 試験の比較解析を行った。

A. 研究目的

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護 3Rs (Replacement・Reduction・Refinement)の観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。本研究では、マウス肺及び肝臓オルガノイドを用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立を目指す。

B. 研究方法

マウスオルガノイドを用いたエピゲノム変化評価系の構築

マウス臓器由来オルガノイドに化学物質を反復暴露した後、エピゲノム変化を同定し、*in vitro*一般毒性試験法における指標を探索する。

④ オルガノイドへのフェノバルビタール (PB) 処置

昨年度研究代表者から分与を受けた Mouse Hepatic Organoids (STEMCELL Technologies ST-70932, C57BL/6 マウスの肝臓由来)を用いた。PB暴露法については研究代表者が検討した方法に準じ、ドーム型培養法でオルガノイドを3日間培養し、1回目の24時間暴露を各対照群(0 μ M)、低用量(236 μ M)、高用量(943 μ M)の濃度で暴露した。24時間後培地の除去、洗浄後新しい培地を添加し、3日間培養を行った。3日間培養後、細胞を再播種し、3日間培養後に2回目の24時間暴露を行った。その後培地を除去、洗浄後、新しい培地を添加し、6日間培養後に、3回目の24時間暴露を行った。暴露後、培地を除去、洗浄後にセルリカバリーソリューションを用いてマトリゲルを溶解し、オルガノイドを細胞塊として回収し凍結した。

(倫理面への配慮)

本年度は分与されたオルガノイドを使用して実験を進めており、動物実験は行っていない。

⑤ PB処置オルガノイドのメチル化解析

PB3回処置後(0 μ M, 243 μ M, 943 μ M, 各N=3)のオルガノイドの細胞塊から、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。メチル化解析はRRBS法 (Reduced Representation Bisulfite Sequencing)を用いた。RRBS法では、制限酵素MspIによる制限酵素消化を行い、フラグメントのサイズ選択を行うことでCpGの豊富な領域を選択することで効率的にCpGサイトのシーケンスを行っている。バイサルファイト処理により、サイズ選択したDNAの非メチル化シトシンをウラシルに変換し、PCR増幅を経て次世代シーケンスを行い、Bismarkを用いてMouse genome (mm10)にアライメントした。次にMethylKit Analysisによるメチル化解析を行い、対照群に対し有意にメチル化率が変化する塩基または領域の同定を行った (q-value<0.01, % methylation difference >25%)。領域ベースの解析についてはゲノムを任意の1kbpに区切り比較を行った。同定した候補はIGV(Intergrative Genomics Viewer)を用いて確認を行った。

⑥ PB処置マウス肝臓のメチル化解析

PBによる*in vivo*毒性試験(対照群 PB 0ppm, 高用量 PB 1000ppm, 各N=5)を行ったC57BL6マウスの凍結肝臓の一部を分担研究者:美谷島から分与を受け、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。その後のメチル化解析については②と同様の手順で行った。

C. 研究結果

① PB処置オルガノイドのメチル化解析

PB処置3回後の(0 μ M, 236 μ M, 943 μ M, 各N=3)オルガノイドのRRBS解析によるメチル化解析を行った。

その結果、染色体毎のメチル化レベルの差は各群で有意な差は見られなかった。CpGサイト全体のメチル化率によるPCA解析からも各群を特徴づける有意な差は見られなかった。対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は479箇所、領域ベースで有意に差がある領域は1箇所であった。

② PB処置マウス肝臓のメチル化解析

PBによる *in vivo* 毒性試験(対照群 PB 0ppm, 高用量 PB 1000ppm, 各N= 5)を行ったC57BL6マウス肝臓のRRBS解析によるメチル化解析を行った。その結果、染色体毎のメチル化レベルの差は群間における有意な差は見られなかったが、高用量5検体のうち1検体のみが他と異なり全体的に高いメチル化を示していることがわかった。CpGサイト全体のメチル化率によるPCA解析からも同様に、群間の有意な差はないものの、高用量5検体のうちの1検体が他との差が大きいことがわかった。対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は4007箇所、領域ベースで有意に差がある領域は91箇所であった。有意差があるものについても、高用量5検体のうちの1検体が他との差が大きいことに依存している傾向が見られたため、高用量5検体のうちの1検体を除いた解析も行なった。対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は2箇所、領域ベースで有意に差がある領域は0箇所であった。

⑦ PB処置オルガノイドとPB処置マウス肝臓のメチル化解析の比較

PB処置3回後の対照群と高用量群の間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は479箇所と、PB処置マウス肝臓の対照群と高用量群の間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は4007箇所のうち、一致する塩基はなかった。また、領域ベースの比較で有意にメチル化が変化する領域1箇所(オルガノイド)と91箇所(肝臓)においても一致する領域はなかった。PB処置マウス肝臓の高用量5検体のうち1検体のみが全体にメチル化率が高く、2群間の比較に影響が出ているようであったため、その1検体を除く解析を行なったが、やはり

D. 考察

PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓(*in vivo*)のメチル変化の比較では共通する1塩基レベルの変化部位、また変化領域はなかった。*in vivo*試験の高用量のうちの1検体のみが他と異なるメチル化状態を示していたため、その結果が影響した可能性を考え、1検体を除いての解析を行ったが、同様に共通したメチル化変化はなかった。組織学的な観察においては、この1検体においても他の高用量の検体と同様に全体的に肝細胞の肥大が見られているとのことで、単純にこの1検体の部分的なサンプリングされた細胞の違いがメチル化の違いに影響したということではないと思われるため、エピゲノムを解析するタイムポイントなど、検討が必要と思われる。*in vitro*、*in vivo*試

験の両者において、顕著なメチル化変化が検出されておらず、暴露方法の検討、他の化学物質での検討が必要と考えられる。例えば、オルガノイドのPB処置後の解析においても、今回3回暴露24時間後といった比較的早い段階で解析を行っており、継代を重ねた後など、何らかの細胞が濃縮される可能性が高くなった後には特定のメチル化変化が濃縮され検出されるということがあるかもしれない。

E. 結論

PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓(*in vivo*)のメチル変化の比較では共通する1塩基レベルの変化部位、また変化領域は同定されなかった。メチル化を指標とする*in vitro*有害性評価手法の確立において、暴露方法、共培養の活用などさらなる条件検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Imai, T. Ishigamori, R. Naruse, M. Ochiai, M. Maru, Y. Hippo, Y. Totsuka, Y. Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems. *J Toxicol Sci.* (2024) 49(10):425-434.

2. Ono, R. Kuwagata, M. Naruse, M. Watanabe, A. Takano, M. Hasegawa, T. Takashima, H. Yoshioka, Y. Ochiya, T. Hirabayashi, Y. Kitajima, S. Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* (2024) vol111, No. 1. 37-56.

2. 学会発表

1. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊「患者由来オルガノイド利用した個別化医療に対応した薬剤耐性原因遺伝子の探索」第83回日本癌学会、一般口頭発表、2024。(福岡)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 in vitro 有害性評価手法の確立
(22KD1001)

研究分担者 美谷島 克宏

東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 教授

研究要旨

本分担研究では、オルガノイドによる新規試験法との類似性を確認するため、毒性対照物質を用いてマウス in vivo 毒性試験を実施し、標的臓器における種々の毒性学的データを取得することを目的として実施した。

本年度は、肝臓毒性陽性対照物質を用いた in vivo 投与試験を実施し、標的臓器における毒性所見の発現を確認した。実際には肝臓を標的とした毒性発現化合物を新たにマウスに反復投与し、病理組織学的観察並びに遺伝子発現解析を実施した。本実験より得られた結果は、in vitro オルガノイドを用いた結果と比較し、新しい毒性学的指標を見出すための情報として班内の研究分担者に共有した。

本分担研究より得られた成果として、肝臓毒性を呈する陽性対照物質を用いた in vivo 投与試験を実施し、実際にマウス肝臓における毒性所見の発現を確認し in vitro 試験と比較対象となる材料を得ることが出来た。その結果は、in vitro オルガノイド試験による新たな毒性指標の開発に寄与し得るものと考えられた。

A. 研究目的

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護 3Rs (Replacement・Reduction・Refinement)の観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。本分担研究では、肝臓オルガノイド培養系を用いた化学物質の新規 in vitro 有害性評価系の確立を目指すため、実際にマウスを用いて in vivo 毒性評価を実施し、オルガノイドを用いた新規評価系の有用なエンドポイントとなり得るかについて検証することを目的とした。

B. 研究方法

分担研究者として、美谷島はオルガノイドによる新規試験法との類似性を確認するため、毒性対照物質を用いてマウス in vivo 毒性試験を実施し、標的臓器である肝臓についての毒性学的データを取得した。

1) In vivo 毒性試験

これまで本分担研究では、雄性C57BL/6Jマウスに、in vitro試験と共通してフェノバルビタール(PB)、カルバミン酸エチル(EC)、クマリン(CMR)、モノクロタリン(MCT)を投与し、さらに、肝細胞壊死など顕著な肝毒性を示す化学物質としてアセトアミノフェン(APAP)を投与し、それぞれの化学物質の肝毒性プロファイルを明らかにしてきた。特に本年度のマウスへの投与は、CMR並びにMCTについて反復投与を行い、それぞれの肝臓毒性を評価した。

1-1) CMRを用いた検討

本分担研究では、マウスにCMRを短期間反復投与することにより生じる肝臓への影響を解析した。具体的な研究内容として、6週齢の雄性C57BL/6J系マウスに、CMRを5,000 ppmで4週間、2,500 ppm並びに5,000 ppmで13週間間断投与した。対照群には標準飼料として粉末CE-2を与えた。給餌期間終了後に解剖し、採血並びに臓器の採取を行った。肝臓については病理組織学的解析並び

に遺伝子発現解析を行った。

1-2) MCTを用いた検討

本分担研究では、マウスにMCTを2ないし4週間間断的に反復投与することにより肝臓への影響を解析した。具体的な研究内容として、6週齢の雄性C57BL/6J系マウスにpHを調整した生理食塩水に溶解してMCTを200 mg/kgの用量で2ないし4週間にわたり週1回の間断腹腔内投与を行った。対照群には同溶媒を投与した。飼料は固形標準食(CE-2)を用いた。投与期間中に体重及び摂水量を測定した。投与期間終了後に解剖し、臓器重量、血液生化学的検査、病理組織学的解析及び遺伝子発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

マウスの使用は最少匹数に留め、東京農業大学動物実験委員会より承認を受けた申請内容に則り実施した。また、他実験で用いたサンプルも検討に用いるなど、使用動物数の低減に努めた。

C. 研究結果

1) In vivo 毒性試験

1-1) CMRを用いた検討

CMRの反復投与により、体重は対照群に対し4及び13週間群ともに減少傾向にあった。肝臓重量は、対照群に対し13週間5,000 ppm群で増加傾向にあった。肝臓の病理組織学的検査では、4週間投与による明らかな変化は見られなかったが、13週間5,000 ppm群で、小葉周辺性の肝細胞肥大、巣状壊死及び炎症性細胞浸潤が認められた。血液生化学的検査では、対照群に対し5,000 ppm群でALT活性が増加ないし増加傾向にあった。FABP2の免疫組織化学染色では、全CMR投与群でより広範囲に陽性肝細胞が確認された。遺伝子発現解析では、肝細胞分化の指標となる因子であるHptr, Alb, CYP 3A11, Krt19, Hnf4aは4週間5,000 ppm群で減少傾向を示し、Sox9は4及び13週間5,000 ppm群で増加傾向を示した。

1-2) MCTを用いた検討

MCTの反復投与により、体重は、対照群に対し4週間投与群で減少傾向を示した。摂餌量は、対照群に対し2週間投与群で減少傾向を示した。血液生化学的検査では、対照群に対しALT及びASTが2週間投与群で増加傾向を示

したが、4週間投与群では明らかな変化は見られなかった。臓器重量では、両投与期間で明らかな影響は見られなかった。病理組織学的解析では、2週間投与群で巣状性肝細胞壊死、4週間投与群で、主に小葉中心性肝細胞のグリコーゲン蓄積の減少が認められた。さらに、対照群に対し両投与期間において2核肝細胞の増加が見られた。さらに、細胞増殖に関わるPCNAの免疫組織化学染色において、対照群に対し両投与期間において陽性細胞が増加傾向を示し、それは2週間投与群でより顕著であった。これに加え、胆管上皮細胞の増殖も認められた。遺伝子発現解析では、TNF α が対照群と比較し、両投与期間において増加傾向を示した。

D. 考察

1) In vivo 毒性試験

1-1) CMR を用いた検討

CMR は、シナモンなど多くの植物に含まれる芳香物質であるが、過剰摂取により肝障害を引き起こすとの報告もある。本分担研究では、マウスに CMR を短期間反復投与することにより生じる肝臓への影響について解析した。その結果、本実験条件において、4週間投与では明らかな組織学的変化は見られなかったが、肝細胞への分化の指標となる遺伝子発現に影響が見られた。一方、13週間投与では組織学的に明らかな肝障害が認められたが、Sox9を除き上記の遺伝子発現に明らかな変化は見られなかった。

1-2) MCT を用いた検討

MCT は、マウスやラットに投与することにより肺高血圧症を誘発することが知られている。肝臓の血流が障害されることで低酸素血症が生じ、肺高血圧症が誘発されるとされている。本分担研究では、マウスに MCT を2ないし4週間間歇的に反復投与することにより肝臓への影響を解析した。その結果、本実験条件において、MCTによる明らかな肝傷害は認められなかった。しかし、2核肝細胞並びに PCNA 陽性肝細胞は増加傾向を示し、さらに、胆管増生を示唆する変化も認められ、MCT反復投与による肝臓への影響が見出された。これより、

両化合物のマウスへの反復投与により、いずれも異なる肝毒性プロファイルを示す結果が得られた。これは今後の *in vitro* 毒性評価系の構築において、新たな評価指標の確立するための研究支援材料が得られたものと考えられた。

E. 結論

PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓(*in vivo*)のメチル変化の比較では共通する1塩基レベルの変化部位、また変化領域は同定されなかった。メチル化を指標とする *in vitro* 有害性評価手法の確立において、暴露方法、共培養の活用などさらなる条件検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 大橋 清佳、田中 あかり、竹田 結菜、神野 涼平、煙山 紀子、笹瀬 智彦、前川 竜也、美谷島 克宏、クマリンの反復投与毒性試験におけるマウス肝臓の病態解析、第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2025.1.31)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立
分担研究課題名： 一次線毛のオルガノイドへの応用

研究分担者 広川 佳史 三重大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

一次線毛発現を指標とする発がん予測、安全性評価法構築への応用を目的として、各種の発がん物質処理を施したマウス肝臓オルガノイドを用いて一次線毛の発現を検索した。一次線毛の軸糸は認められなかったが、一次線毛の構造体である中心小体の発現に変化がみられた。特にフェノバルビタール処理オルガノイドでは中心小体の数が増加した。がんの初期過程で中心体の過剰複製は染色体不安定化を誘発することが知られており、発がん物質のオルガノイドにおける有害性評価の指標になりうることを示唆された。

A. 研究目的

細胞膜から突出する不動性線毛である一次線毛は正常細胞やがんの増殖などに関与するシグナルハブであることが知られている。一次線毛には、受容体やエフェクターが存在し、各種のシグナル伝達系に関わる。また、一次線毛は、半永久的に突出する構造体ではなく、正常細胞では細胞周期に関わり、G0/G1 期で出現、分裂期では消失する。一次線毛の形成・消失は各種シグナル伝達と連動している。一次線毛は、細胞周期に関与するという単純なものではなく、発生・分化、細胞可塑性など多彩な生命現象に関与することが明らかにされつつある。分担研究者はこれまでに、鰐渕班より提供を受けた、発がん性化合物被曝ラットの肝臓組織標本を用いて一次線毛の軸糸を構成するタンパク質（ α -acetylated tubulin）の発現を検索したが、肝細胞に一次線毛はわずかに発現するのみであった。肝臓では幹細胞に一次線毛が発現するという報告があるため、本班研究で用いられているマウス肝臓オルガノイドに各種の発がん物質処理を施した組織を用いて、一次線毛の発現を評価した。

B. 研究方法

分担研究者より提供を受けた、発がん性化合物処理のマウス肝前駆細胞オルガノイド標本を用いて一次線毛を構成する軸糸（抗 α -acetylated tubulin 抗体）、中心小体（抗 γ -tubulin）に対する蛍光免疫染色をおこなった。また中心小体の増幅に関与する Polo-like kinase 4 に対する抗体を用いて蛍光免疫染色をおこなった。化合物はフェノバルビタール、カルバミン酸エチル、モノクロタリン、クマリンである。

C. 研究結果

一次線毛のいわゆる“毛”に相当する軸糸に存在する α -acetylated tubulin はオルガノイドで検出できなかった。そこで一次線毛の構成成分で基部に存在する中心小体の検出を試みた。

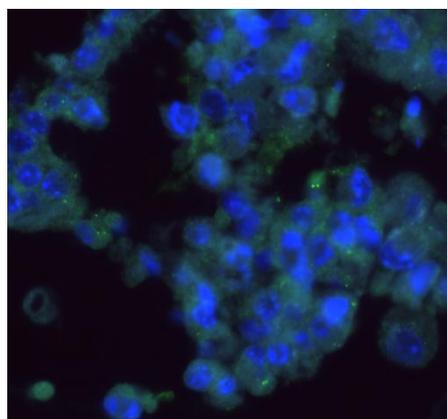


図1 コントロール（DMSO）オルガノイドの中心小体。細胞質に緑色のドット状の中心小体が1個ないし2個見られる。

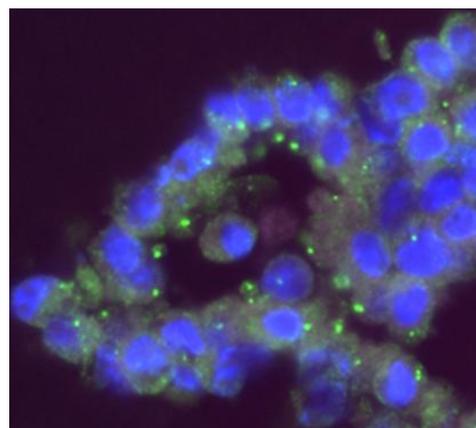


図2 フェノバルビタール（低濃度）オルガノイドの中心小体。細胞質に緑色のドット状の中心小体が1個ないし2個明瞭に見られる。

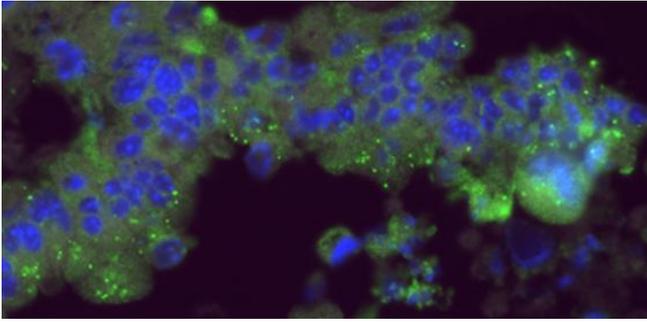


図3 フェノバルビタール（高濃度）オルガノイドの中心小体。細胞質に緑色の微細ドット状の中心小体が複数個見られる細胞がある。

中心小体の変化が最も顕著に見られたのはフェノバルビタール処理オルガノイドであった。特に高濃度フェノバルビタール処理では、細胞内に中心小体が過剰に増幅しているのが認められた（図1, 2, 3）。他の化合物処理では中心小体の細胞内局在の変化が、細胞の変性などによる影響を除外できなかった。

Polo-like kinase 4 (PLK4) は中心小体複製の主要な調節因子であり、腫瘍での過剰発現が報告されている。また *in vitro* では PLK4 の過剰発現が中心体の過剰複製を引き起こすことが知られているため、中心小体と PLK4 の共発現を各化合物処理オルガノイドで検討した。中心小体と PLK4 共局在は観察されず、各オルガノイドは中心小体が複製される時期の細胞ではないことが示唆された。

D. 考察

生体の肝臓では少数ながら一次線毛は観察され、肝障害時の再生に一次線毛陽性の前駆細胞が関与する（*Journal of Hepatology* 2013 vol. 60, 143-151）。今回用いた各化合物処理のオルガノイドでは完成された一次線毛は観察されなかったが、生体とは異なる環境条件によるものと考えられる。一次線毛の軸糸が伸びる基部に相当する中心小体はオルガノイドの細胞にも発現しており、フェノバルビタール高濃度処理では中心小体の増加が認められた。中心体の過剰複製は染色体不安定化を誘発し、がん化

の初期課程に関与する。その機序としては細胞周期の停止や延長による中心体複製の制御破綻があるとされている（*BMB Rep.* 2023; 56, 216-224）。従って、フェノバルビタールの有害性評価の一つとして、中心小体の数的過剰が指標になりうるを考える。その他の化合物で明瞭な中心小体の過剰が観察されなかったのは、細胞の変性などが影響し、中心小体検出の至適条件ではなかった可能性が考えられる。今後は各化合物で中心小体が検出される至適条件の検討、また濃度依存性の有無などを検証する必要があると考える。

E. 結論

一次線毛の構造体である中心小体はフェノバルビタール処理により過剰複製された。このことは染色体不安定化を誘発してがん化に関与するため、有害性評価の指標になりうることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanayama K, Imai H, Hashizume R, Matsuda C, Usugi E, Hirokawa YS, Watanabe M. Extrachromosomal DNA dynamics contribute to intratumoural receptor tyrosine kinase genetic heterogeneity and drug resistance in gastric cancer. *Mol Cancer Res.* 2025 Feb 19. doi: 10.1158/1541-7786. MCR-24-0741.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立
(22KD1001)

研究分担者 西村 有平 三重大学大学院医学系研究科統合薬理学分野 教授

研究要旨

ゼブラフィッシュの様々な細胞における一次線毛を蛍光免疫染色法により可視化し、画像解析ソフトを用いて定量化する手法を確立した。この手法を用いて、カルバミン酸エチル（10 mM）、トリクロロエチレン（760 nM）の四日間曝露（受精後3日目から7日目まで）により、ゼブラフィッシュ脳の細胞の一次線毛が短くなることを明らかにした。本手法を用いて、ゼブラフィッシュの様々な細胞において化学物質の曝露による一次線毛の形態変化を評価することができる。

A. 研究目的

ゼブラフィッシュの一次線毛を免疫染色法により可視化し、解析ツールを用いて一次線毛の形態を定量化する手法を確立すること。その手法を用いて、化学物質の曝露による一次線毛の形態変化を定量的に評価すること。

B. 研究方法

様々な細胞の一次線毛にEGFPを発現するゼブラフィッシュの組織切片を作製し、EGFPに対する抗体を用いた免疫染色により、一次線毛を可視化した。画像解析ソフト（CiliaQ）を用いて、一次線毛の形態を定量的に解析した。また、カルバミン酸エチルやトリクロロエチレンをゼブラフィッシュに曝露（受精後3日目から7日目まで）し、脳における一次線毛の形態変化を解析した。

C. 研究結果

一次線毛の形態を定量的に解析する手法を確立した。この手法を用いて、カルバミン酸エチル（10 mM）、トリクロロエチレン（760 nM）の曝露（受精後3日目から7日目まで）により、ゼブラフィッシュ脳の細胞の一次線毛が短くなることを明らかにした。

D. 考察

本研究で確立した一次線毛の定量的解析手法を用いて、カルバミン酸エチルやトリクロロエチレンの曝露による胆管上皮細胞の一次線毛形態を評価可能と考えられる。

E. 結論

本研究で確立した一次線毛の定量的解析手法を用いて、化学物質の曝露による一次線毛の形態変化を様々な細胞において評価することができる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. Yuhei Nishimura, Exploration of therapeutic agents targeting trichoplein-mediated ciliogenesis, Anatomy-Physiology-Pharmacology Week in 2025 (APPW2025) March 17. 2025

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hasegawa S, Shoji Y, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Mimaki S, Tsuchihara T, Totsuka Y.	Whole genome sequencing analysis of model organisms elucidates the association between environmental factors and human cancer development.	International Journal of Molecular Sciences	25	11191	2024
Watanabe K, Komiyama M, Obikane A, Miyazaki T, Ishino K, Ikegami K, Hashizume H, Ishitsuka Y, Fukui T, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Totsuka Y.	Development of a genotoxicity/carcinogenicity assessment method by DNA adductome analysis.	Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis	899	503821	2024
Imai T, Ishigami R, Naruse M. , Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, Totsuka Y.	Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems.	The Journal of Toxicological Sciences	49 (10)	425-434	2024
Vachiraarunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M. , Qiu G, Guo R, Yamamoto T, Kakehashi A, Shiota M, Wanibuchi H.	Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells.	Archives of Toxicology	98	2065-2084	2024
Gi M, Suzuki S, Kanki M, Yokohira M, Tsukamoto T, Fujioka M. , Vachiraarunwong A, Qiu G, Guo R, Wanibuchi H.	A novel support vector machine-based 1-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats.	Archives of Toxicology	98	2711-2730	2024

Suzuki S, Gi M, Kobayashi T, Miyoshi N, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M , Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Suemizu H, Wanibuchi H.	Urinary bladder carcinogenic potential of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) in humanized-liver mice.	Toxicological Sciences	202	210–219	2024
Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M , Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H.	Metabolism and effects of acetoacetate-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice.	Journal of Toxicologic Pathology	38	59–67	2025
Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M , Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H.	Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product PloomTECH+ and 3R4F reference cigarettes.	Journal of Toxicologic Pathology	38	147–154	2025
Fujioka M , Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H.	Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats.	Journal of Toxicologic Pathology	38	161–165	2025
Ono R, Kuwagata M, Naruse M , Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S.	Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice.	Fundamental Toxicological Sciences	11(1)	37–56	2024
Kanayama K, Imami H, Hashizume R, Matsuda C, Usugi E, Hirokawa Y , Watanabe M.	Extrachromosomal DNA dynamics contribute to intratumoural receptor tyrosine kinase genetic heterogeneity and drug resistance in gastric cancer.	Molecular Cancer Research	doi: 10.1158/1541-7786.MCR-24-0741.		2025

西村 有平	一次繊毛を介した脂肪前駆細胞・間葉系前駆細胞の機能制御	日本薬理学雑誌	159 (4)	188-191	2024
-------	-----------------------------	---------	---------	---------	------

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 星薬科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 牛島 俊和 _____

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立
3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学部・教授
(氏名・フリガナ) 戸塚 ゆ加里 (トツカ・ユカリ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人 大阪

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 福島 伸一

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大阪公立大学大学院医学研究科・特任講師
(氏名・フリガナ) 藤岡 正喜 (フジオカ マサキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 in vitro 有害性評価手法の確立
3. 研究者名 (所属部署・職名) ウイルス第一部 主任研究官
(氏名・フリガナ) 成瀬 美衣 (ナルセ ミエ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

- (留意事項)
- ・該当する□にチェックを入れること。
 - ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 東京農業大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 江口 文陽

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立
3. 研究者名 (所属部署・職名) 応用生物科学部食品安全健康学科・教授
(氏名・フリガナ) 美谷島 克宏 (ミヤジマ カツヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無	<input checked="" type="checkbox"/>	東京農業大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 三重大学

所属研究機関長 職 名 研究科長

氏 名 平山 雅浩

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立

3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学研究科・准教授

(氏名・フリガナ) 広川佳史・ヒロカワヨシフミ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
			審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人三重大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 伊藤 正明

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立
3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学系研究科・教授
(氏名・フリガナ) 西村 有平 (ニシムラ ユウヘイ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
			審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。