

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

**化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および
in vitro リスク評価法開発のための研究
(24KD1001)**

(令和) 6 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 薫

(令和) 6 (2025) 年 5 月

作成上の留意事項

分担研究報告書がある場合は、「総括・分担研究報告書」と表記すること。

目 次

I. 総括研究報告

化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および in vitro リスク評価法開発のための研究 -----	1
研究代表者 佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部第一室 室長	

II. 分担研究報告

1. 神経細胞、ミクログリアの採材法開発と細胞老化指標の明確化 -----	9
研究分担者：最上由香里 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部	
2. 転写に関連した突然変異生成の解析 -----	17
研究分担者 堀端克良 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センターゲノム安全科学部	
研究分担者 杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センターゲノム安全科学部	
3. 化学物質によるゲノム毒性検出法の開発 -----	24
研究分担者 伊澤和輝 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センターゲノム安全科学部	
研究分担者 杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センターゲノム安全科学部	
4. DNAメチル化異常を介した化学物質によるゲノム毒性の検出 -----	30
研究分担者 鈴木孝昌 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センターゲノム安全科学部	
研究分担者 杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センターゲノム安全科学部	
5. 化学物質によるゲノム毒性等生体影響の最小化に関する検討 -----	38
研究分担者 小泉修一 山梨大学 医学部長・薬理学教授	
6. 自然老化マウスの作出 -----	39
研究分担者 柳井修一 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター 東京都健康長寿医療センター研究所 専門副部長	

専門副部長

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	40
----------------------------------	----

化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および in vitro リスク評価法開発のための研究

研究代表者 佐藤 薫

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター
薬理部第一室 室長

—研究要旨—

近年、化学物質等が細胞分裂終了後の体細胞に DNA 突然変異やメチル化等のエピジェネティクス異常を引き起こすことが明らかとなり、ヒト健康影響が懸念されている。本研究ではゲノム毒性の in vitro リスク評価系を開発することを3年間の研究目的とする。今年度は以下の成果を得た。

化学物質によるゲノム毒性検出法の開発

- ① 次世代シーケンサー（NGS）のエラーを低減し低頻度の体細胞突然変異を検出可能とした error-corrected sequencing（ecNGS）を適用する。ecNGS 解析に必要な量の DNA 断片分子を確保する手法について検討し、PCR 法により従来法の 10 分の 1 程度の DNA 量（50ng 程度、1 万細胞程度）から十分量の DNA 断片分子を確保することに成功した。また、細胞・DNA 量の少ない条件に適用する手法を検討し、従来法の 10 分の 1 程度の DNA 量（100ng 程度、2 万細胞程度）で ecNGS による解析を可能とする条件を見いだした。
- ② DNA メチル化等のいわゆるエピジェネティックな変化も、ゲノムの不安定性誘発の原因として無視できない。肝臓での遺伝子発現データを元に、遺伝毒性物質特異的に発現変化する 4 遺伝子（Bax, Btg2, Ccng1, Cdkn1a）が遺伝毒性の予測に有効であることを論文発表した。さらに、神経細胞、ミクログリアにおいてメチル化等エピジェネティクス異常を呈するターゲット遺伝子群等を文献調査した。その結果、グルココルチコイド受容体遺伝子（NR3C1）、オキシトシン受容体（OXTR）、TAR DNA-binding protein 43（TDP-43）などを候補として見いだした。また、DNA メチル化異常を引き起こす側の化学物質、いわゆる“epi-mutagen”の存在についても調査を行った。
- ③ DNA メチル化異常の検出系として、ナノポアシーケンサー MinION を用いて直接メチル化塩基を検出することによる簡便迅速な解析手法の開発を行った。さらに最近報告された片側鎖の変異、すなわち mismatch 変異も検出できるという ecNGS 法である HiDEF-Seq 法についても応用可能性を調査した。
- ④ サイレントな細胞での DNA 影響のメカニズムとして、転写に関連した突然変異生成（Transcription-associated mutagenesis; TAM）に注目した。TAM の検出、解析には DNA 複製の影響を抑制しなければならぬため、CDK 阻害剤等を用いた適切な細胞分裂制御条件を見いだした。

神経細胞、ミクログリアの採材法開発と細胞老化指標の明確化

Miltenyi Biotec 社の MACS Sample Preparation 法を導入し、若齢マウスと老齢マウスから、ゲノム毒性解析チームが求めるクオリティ（細胞数、生存率、純度）での神経細胞とミクログリアの分離手法を確立した。細胞レベルでの老化指標の整備を進め、分取細胞の培養方法を確立した。

化学物質によるゲノム毒性等生体影響の最小化に関する検討

ミクログリアのゲノム毒性リカバリー法の基礎条件抽出と最適化を行った。そのために、Colony stimulating factor-1 受容体（CSF1R）拮抗薬の ON/OFF とミクログリアの（1）経鼻移植、及び（2）局所注入 の組み合わせにより、ミクログリアを移植、置換する技術を確立した。

研究分担者

最上由香里（国立医薬品食品衛生研究所）
杉山圭一（国立医薬品食品衛生研究所）
堀端克良（国立医薬品食品衛生研究所）
伊澤和輝（国立医薬品食品衛生研究所）
鈴木孝昌（国立医薬品食品衛生研究所）
小泉修一（山梨大学）
柳井修一（東京都健康長寿医療センター）

A. 研究目的

本研究ではゲノム毒性の in vitro リスク評価系を開発することを3年間の研究目的とする。近年、化学物質等が細胞分裂終了後の体細胞に DNA 突然変異（Knobel et al., 2022）やメチル化等のエピジェネティクス異常（Lodato, Ziegenfuss, 2022）を引き起こすことが明らかとなり、ヒト健康影響が懸念されている。そこで、このような体細胞突然

変異やエピジェネティクス異常等のゲノム毒性の検出法を確立する。このために、生後、体細胞分裂がほとんど起こらない神経細胞と体細胞分裂が非常にゆるやかなミクログリアをモデル細胞として使用することにした。若齢マウスと老齢マウスからこれらの細胞を分取し、経年蓄積した体細胞突然変異やエピジェネティクス異常等を評価可能とする検出技術を確認する。一方、体細胞突然変異は細胞老化度と関連していることも報告されていることから (Miller et al., 2022)、体細胞突然変異と細胞老化指標との関連性を検証する。加えて、化学物質影響への脆弱性、体細胞突然変異、細胞老化、との関連性を検証する。以上の研究により *in vitro* ゲノム毒性リスク評価系を開発することは化学物質管理推進のために重要である。今年度は化学物質によるゲノム毒性検出法の開発、神経細胞、ミクログリアの採材法開発と細胞老化指標の明確化、化学物質によるゲノム毒性等生体影響の最小化に関する検討、に取り組んだ。

B. 研究方法

化学物質によるゲノム毒性検出法の開発

- ① ゲノム毒性検出法として、次世代シーケンサー (NGS) のエラーを低減し低頻度の体細胞変異を検出可能とする **error-corrected sequencing (ecNGS)** 法が開発され、世界的に注目されている。生体組織において細胞分裂を終了した細胞は、細胞分裂を終了していない細胞に比べ、時間経過とともに細胞集団内でその割合を小さくしていくと考えられるが、これまで ecNGS は細胞や DNA 量が潤沢な条件で利用されてきたため、本研究で着目するような、少数細胞あるいは採取可能な DNA 量が少ない条件での実施例が少ない。そのため、まず ecNGS 解析に必要な量の DNA 断片分子を確保する手法を検討した。まず、PCR 法による DNA 断片分子確保を行った。ラット由来のゲノム DNA 50ng から、NGS 解析可能な DNA 断片分子 (ライブラリ) を作製した。シーケンスには NovaSeq (Illumina, Inc., USA) を用い、シーケンスデータの解析についてはキット付属のプロトコルに従った。従来手法のプロトコル改良による DNA 断片分子確保も行った。従来の ecNGS 手法である PECC-Seq 法 (You et al., 2020) においては、酵素反応による DNA 断片化ステップにおいて、ビーズ精製によるフラグメントスクリーニングで多くの DNA を損失していると考えられた。そこでフラグメントスクリーニングのステップをスキップした。得られたリードデータについて、アダプター配列を Trimmomatic (v0.39) を用いて除去した。その後、公開されているヒトのゲノム配列 (GRCh38.p14) に対し、Burrows-Wheeler aligner (BWA) の bwa

mem モードによってリードのマッピングを行った。

- ② DNA メチル化異常は、細胞内のエピジェネティックな制御機構の破綻を示す指標となり得る。こうした背景から、DNA メチル化異常の検出系開発は、ゲノムの不安定性のスクリーニングと化学物質の安全性評価の両面で極めて重要な意義を持つ。最近、第三世代の一分子シーケンサーとされるナノポア型のシーケンサーを用いることにより、煩雑な前処理なく直接 DNA メチルを検出できることが報告された。このナノポアシーケンサーを用いた DNA メチル化検出法の開発を進めた。
- ③ 神経細胞、ミクログリアにおける体細胞変異およびエピジェネティクス異常のターゲット遺伝子、誘導因子を文献調査した。その原因物質として、エピジェネティックな異常を誘発する物質、いわゆる“epi-mutagen”の存在に関しても、これまでわかっていることを調査した。
- ④ DNA 複製以外で体細胞突然変異に直接関わる主な細胞内機能は転写である。“転写に関連した突然変異生成” (transcription-associated mutagenesis; TAM) に着目し、これまでに研究分担者が樹立している CHO 系細胞をベースとした TAM 解析系 (CHO/TAM 解析系) を用いて、転写制御下において化学物質が介在する突然変異誘発における TAM の寄与を明らかにする評価系を確立した。

神経細胞、ミクログリアの採材法開発と細胞老化指標の明確化

老化促進 SAM 系統マウスの遺伝子背景に関する研究班内議論に基づき、まずは自然老化マウスからの細胞収集を優先することにした。若齢マウス (C57BL/Ncr 3 ヶ月齢♂) 老齢マウス

(C57BL/Ncr 24 ヶ月齢♂) は東京都健康長寿医療センター研究所より入手した。マウスを深麻酔下で心灌流により脱血し、迅速に脳を摘出した後、顕微鏡下で前脳を採取した。脳サンプルを Gentle MACS Dissociators (Miltenyi Biotec 社) を用いて分散した。その後、磁気ビーズ抗体を用いた MACS 法により神経細胞とミクログリアを分離した。MACS Quant Analyser 10 (Miltenyi Biotec 社) を用いて FACS 解析を行い、分離した細胞の細胞数、純度、生存率を検討した。老化指標検討の基礎技術として単離神経細胞、ミクログリア細胞の培養プロトコルを確立した。これらの細胞は免疫組織化学的に検討を行い、各細胞マーカーの発現、機能タンパク質発現を共焦点レーザー顕微鏡システムにて確認した。

化学物質によるゲノム毒性等生体影響の最小化に関

する検討

ミクログリアのゲノム毒性リカバリー法の基礎条件抽出と最適化を行った。ミ Colony stimulating factor-1 受容体 (CSF1R) 拮抗薬の ON/OFF によりミクログリアをリセットするための濃度、タイミングを最適化した。ミクログリアの移植には2つの方法を用いた。(1) 完全非侵襲的置換によるミクログリアの全脳置換：ミクログリアの経鼻移植。(2) 微侵襲的なミクログリアの局所的置換：ミクログリアの外科的移植。以上の処置によるミクログリアの定着状況を解析し、実験条件を最適化した。

(倫理面への配慮)

「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」、「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」を遵守して研究遂行した。

C. 研究結果および考察

化学物質によるゲノム毒性検出法の開発

- ① PCR 法による DNA 断片分子 (ライブラリ) 必要量確保のためには、ThruPLEX® Tag-Seq HV kit を用いた。DNA50ng から本キットを用いて2回の処理を行った結果平均して約443nMの濃度のライブラリが得られた。標準的なライブラリの濃度としては5nM程度の濃度が目標となるため、十分量のライブラリが得られたと言える。より少ないDNA量からでも十分量のライブラリが作製できると考えられる。加えて、ecNGS 解析の際には PCR によるエラーがバックグラウンドの変異頻度として検出されてしまうと考えられるが、標準プロトコルにおける PCR サイクルをより少ない回数に設定することが可能であり、これにより PCR エラーを低減することができると考えられる。従来手法のプロトコル改良による DNA 断片分子確保も行った。実際にフラグメントスクリーニングのステップを行わずに作製したライブラリは約4.6nMで目標濃度に近い濃度が得られた。得られたライブラリについてシーケンシング・マッピング解析を行った結果から DNA 断片長を計算したところ、100bp 以下、および 250bp 以上の部分まで幅広くリードが存在している一方で150bp 付近にピークが存在し、量・質共に既存手法での解析に十分なライブラリが得られたと考えられる。
- ② 本研究にて必要となる簡便迅速な DNA メチルの検出法の開発に関しては、DNA のグローバルメチレーション (5mC, 5hmC) を比較的簡便に測定できる系を開発できている、来年度はその手法を用いて本研究課題におけるサンプルのメチル化レベルの検討に応用が可能となっている

。また、現在はグローバルメチル化レベルの解析のみであるが、来年度には個別遺伝子のメチル化レベルの解析も可能となる。

- ③ 脳神経系疾患を例にエピジェネティックな影響を受ける標的遺伝子として、メチル化に焦点を絞って調査したところ、
 - ・うつ病や心的外傷後ストレス障害 (PTSD)等のトラウマとグルココルチコイド受容体遺伝子 (NR3C1) メチル化
 - ・虐待などのマルトリートメント (不適切な養育) とオキシトシン受容体 (OXTR) のメチル化
 - ・筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) のメチル化等の例を見いだした。エピジェネティック異常は、酸化ストレスや炎症、ミトコンドリア機能の喪失などを介して各種疾患や老化へ結び着くと考えられ、化学物質によりもたらされるエピジェネティックな異常の評価は、今後重要な課題となる。また、肝臓での遺伝子発現データを元に、遺伝毒性物質特異的に発現変化する4遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, Cdkn1a) が遺伝毒性の予測に有効であることを論文発表した。エピジェネティック異常を引き起こす epi-mutagen については、これまであまり調べられていないため、文献調査を行った。diethylphosphate, cotinine, octachlorodipropyl ether, mercury, selenium の5化合物がヘテロクロマチンの状態に変化を与え、Hg と Se は DNA メチル化異常を引き起こすこと、benzene, hydroquinone, styrene, carbon tetrachloride, trichloroethylene がグローバルメチレーションの低下を誘発すること、が報告されていた。本研究班で用いる神経系の細胞では、分裂頻度が高いため二本鎖間の変異として固定される確率が低く、通常の ecNGS 法では検出が難しいことが懸念されるが、一本鎖状態での変異も検出する新規 ecNGS 法である HiDEF-Seq 法、Revio シークエンサー活用も考慮したい。
- ④ CHO-KTG5 細胞株を用いる CHO/TAM 解析系において、細胞濃度計測により接触阻害や無血清下での細胞分裂活性を確認した結果、どちらの条件でもまったく細胞分裂活性の抑制が見られなかった。他方、CDK 阻害剤等の処理下では細胞分裂活性が抑制される処理条件を明らかにした。これらの条件下での細胞周期を解析した結果、陰性対照群と比較し、ALLN 処理により S 期の抑制が見られた Roscovitine は S 期の抑制が見られるものの、完全な抑制ではなかった。Roscovitine では、ほぼすべての細胞での S 期の抑制が見られた。今回フローサイトメーター解析時のサイトグラムが若干乱れることなどから二重染色での工夫が必要であると考えられる。今回の結果により、ALLN または Roscovitine 処理により S 期の抑制条件が確認で

きたため、今後はこれらの条件下において、アルキル化剤などによる TAM 解析を実施する。

神経細胞、ミクログリアの採材法開発と細胞老化指標の明確化

FACS 解析の結果、神経細胞の平均取得細胞数は、成体マウスで 8.92×10^4 個/匹、老齢マウスで 5.74×10^4 個/匹であり、純度は成体マウスで 95.13%、老齢マウスで 96.19%、生存率は成体マウスで 89.14%、老齢マウスで 99.13% であった。ミクログリアの平均取得細胞数は、成体マウスで 4.12×10^4 個/匹、老齢マウスで 3.02×10^4 個/匹であり、純度は成体マウスで 92.14%、老齢マウスで 88.01%、生存率は成体マウスで 98.33%、老齢マウスで 98.68% であった。ゲノム毒性解析チームが求めるクオリティで細胞を取得できた。若齢マウスと比較して老齢マウスでは、体重が 2 倍になっているにもかかわらず、前脳の大きさはほとんど変化していないことが示された。回収後の神経細胞、ミクログリアの細胞数、生存率、純度は MACS Quant Analyzer10 で検証した。若齢マウスでは平均神経細胞数が 8.9×10^4 、純度は 95.14%、細胞生存率 89.14% であること、またそのうち成熟神経細胞のマーカーとして知られる NeuN 陽性細胞の平均細胞数は 7.5×10^4 、純度は 84.3% であることが示された。一方、老齢マウスでは細胞数が平均細胞数 5.7×10^4 、純度は 96.19%、細胞生存率 99.14% であること、またそのうち NeuN 陽性平均細胞数は 4.3×10^4 、純度は 75.14% であることが示された。ミクログリアについては、若齢マウスでは平均細胞数が 4.12×10^4 、純度は 92.15%、細胞生存率 98.33% であること、そのうちミクログリア特異的マーカーとして知られる TMEM119 陽性細胞の平均細胞数は 3.53×10^4 、純度は 85.78% であることが示された。老齢マウスでは平均細胞数が 3.02×10^4 、純度は 88.02%、細胞生存率 98.68% であること、そのうち TMEM119 陽性平均細胞数は 2.34×10^4 、純度は 77.34% であることが示された。

細胞老化指標について検討するため、分取した神経細胞、ミクログリアの長期培養条件の検討および免疫組織化学的検討によるマーカータンパク質、機能タンパク質発現の確認を行った。細胞数が多くとれないことから、ドロップ培養法が適切であることが示された。若齢、老齢マウス由来神経細胞を 14 日間培養した結果、両群において、複数の Tuj1(+)/MAP2(+) 神経突起を有する神経細胞を確認した。老齢マウス由来神経細胞の生存細胞数は、若齢マウス群と比較して顕著に低かった (data not shown)。若齢、老齢マウス由来ミクログリアを 7 日間培養した結果、両群由来細胞においてミクログリアマーカーである Iba1 が発現していることを確認した。老齢マウス由来ミクログリアでは、炎症応答活性化マーカーである iNos の発現が高く、細胞体内に複数の大きなドット状のシ

グナルが観察された。また、培養後のミクログリアの生存細胞数は、若齢、老齢マウス間で顕著な相違は認められなかった。神経細胞は、脳細胞集団より、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、血管内皮細胞、線維芽細胞を除いた濃縮液であり、神経細胞に加え、神経前駆細胞、グリア前駆細胞、その他の脳細胞などが含まれる可能性があるが、約 8 割が NeuN 陽性であることが示され、ほぼ成熟した神経細胞であることが確認できた。さらに我々は、採材神経細胞の培養プロトコルを整備し、取得神経細胞に Tuj1(+)/MAP2(+) 神経突起観察に成功した。また、若齢、老齢マウス由来神経細胞は培養 14 日目では、若齢マウス群と比較して老齢マウス群では、顕著に生存率が低下していた (Data not shown)。細胞老化との関連が示唆される。

化学物質によるゲノム毒性等生体影響の最小化に関する検討

CSF1R 拮抗薬 PLX5622 (1,200ppm) を 1-2 週間餌に混ぜて投与することで、すべての脳部位においてミクログリアの 90% 以上を除去できることが明らかとなった。また、CSF1R 拮抗薬を OFF にし、翌日ミクログリアの経鼻移植、局所外科移植を行うことにより、いずれの方法でも、移植後最低 2 ヶ月間は移植ミクログリアが正常に定着でき、今後のさらなる検討に使用可であることが明らかとなった。ミクログリア移植技術を開発し、化学物質及び加齢により異常となったミクログリアを置換することが可能となった。今後、ゲノム毒性とミクログリア異常の因果関係解明、毒性発現メカニズム解明、ゲノム毒性最小化への応用が期待できる。

D. 結論

化学物質によるゲノム毒性検出法の開発

- ① 次世代シーケンサー (NGS) のエラーを低減し低頻度の体細胞突然変異を検出可能とする error-corrected sequencing (ecNGS) を適用する。ecNGS 解析に必要な量の DNA 断片分子を確保する手法について検討し、PCR 法により従来法の 10 分の 1 程度の DNA 量 (50ng 程度、1 万細胞程度) から十分量の DNA 断片分子を確保することに成功した。また、細胞・DNA 量の少ない条件に適用する手法を検討し、従来法の 10 分の 1 程度の DNA 量 (100ng 程度、2 万細胞程度) で ecNGS による解析を可能とする条件を見いだした。
- ② DNA メチル化等のいわゆるエピジェネティックな変化も、ゲノムの不安定性誘発の原因として無視できない。肝臓での遺伝子発現データを元に、遺伝毒性物質特異的に発現変化する 4 遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, Cdkn1a) が遺伝毒性の予測

に有効であることを論文発表した。さらに、神経細胞、ミクログリアにおいてメチル化等エピジェネティクス異常を呈するターゲット遺伝子群等を文献調査した。その結果、グルココルチコイド受容体遺伝子 (NR3C1)・オキシトシン受容体 (OXTR)、TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)などを候補として見いだした。また、DNAメチル化異常を引き起こす側の化学物質、いわゆる“epi-mutagen”の存在についても調査を行った。

- ③ DNAメチル化異常の検出系として、ナノポアシーケンサーMinIONを用いて直接メチル化塩基を検出することによる簡便迅速な解析手法の開発を行った。さらに最近報告された片側鎖の変異、すなわち mismatch 変異も検出できるという ecNGS 法である HiDEF-Seq 法についても応用可能性を調査した。
- ④ サイレントな細胞での DNA 影響のメカニズムとして、転写に関連した突然変異生成 (Transcription-associated mutagenesis; TAM) に注目した。TAM の検出、解析には DNA 複製の影響を抑制しなければならぬため、CDK 阻害剤等を用いた適切な細胞分裂制御条件を明らかとした。

神経細胞、ミクログリアの採材法開発と細胞老化度標の明確化

Miltenyi Biotec 社の MACS Sample Preparation 法を導入し、成体マウスと老齢マウスから、ゲノム毒性解析チームが求めるクオリティ (細胞数、生存率、純度) での神経細胞とミクログリアの分離手法を確立した。細胞レベルでの老化指標の整備を進め、分取細胞の培養方法を確立した。

化学物質によるゲノム毒性等生体影響の最小化に関する検討

する検討

ミクログリアのゲノム毒性リカバリー法の基礎条件抽出と最適化を行った。そのために、Colony stimulating factor-1 受容体 (CSF1R) 拮抗薬の ON/OFF とミクログリアの (1) 経鼻移植、及び (2) 局所注入の組み合わせにより、ミクログリアを移植、置換する技術を確立した。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugiyama K, Grúz P, Sato K, Honma M. Effects of carminic acid on gene expressions under epigenetic regulation. *Biochem Biophysics Rep.* (in press)
2. *佐藤 薫, 高橋裕次, 鈴木郁朗: in vivo イメージングと MPS 導入による非臨床評価系の予測性向上の可能性—中枢神経系痙攣リスク予測と吸入薬の肺胞送達を例として. *YAKUGAKU ZASSHI*, in press (*: Corresponding author)

3. Nakayama-Kitamura K, Shigemoto-Mogami Y, Piantino M, Naka Y, Yamada A, Kitano S, Furihata T, Matsusaki M, *Sato K. Collagen I Microfiber Promotes Brain Capillary Network Formation in Three-Dimensional Blood-Brain Barrier Microphysiological Systems. *Biomedicines.* 2024, 12 (11) 10.3390/biomedicines12112500.
4. Shigemoto-Mogami Y, Nakayama-Kitamura K, *Sato K. The arrangements of the microvasculature and surrounding glial cells are linked to blood-brain barrier formation in the cerebral cortex. *Front Neuroanat.* 2024, 18:1438190.
5. Takahashi K, *Sato K. The conventional and breakthrough tool for the study of L-glutamate transporters, *Membranes.* 2024, 14, 77.
6. Sugiyama K*, Grúz P, Sato K, Honma M. Effects of carminic acid on gene expressions under epigenetic regulation. *Biochem Biophysics Rep.* in press.
7. Furuhashi A., Sugiyama, K. and Honma, M: Ames mutagenicity of 15 aryl, benzyl, and aliphatic ring N-nitrosamines, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 156 105763 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2024.105763>
8. Muto, S., Furuhashi, A., Yamamoto, M., Otagiri, Y., Koyama, N., Hitaoka, S., Nagato, Y., Ouchi, H., Ogawa, M., Shikano, K., Yamada, K., Ono, S., Hoki, M., Ishizuka, F., Hagio, S., Takeshita, C., Omori, H., Hashimoto, K., Chikura, S., Honma, M., Sugiyama, K. and Mishima, M: Local QSAR based on quantum chemistry calculations for the stability of nitrenium ions to reduce false positive outcomes from standard QSAR systems for the mutagenicity of primary aromatic amines, *Genes and Environ.* 46, 24 (2024). <https://doi.org/10.1186/s41021-024-00318-4>
9. Parsons BL, Beal MA, Dearfield KL, Douglas GR, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Kenyon M, Long AS, Lovell D, Lynch AM, Myers MB, Pfuhrer S, Vespa A, Zeller A, Johnson G, White PA. Severity of Effect Considerations Regarding the Use of Mutation as a Toxicological Endpoint for Risk Assessment: A Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Environmental and Molecular Mutagenesis.* in press
10. Shimizu N, Izawa K, Washif M, Morozumi R, Hirota K, Tsuda T: Role of TDP2 in the repair of DNA damage induced by the radiomimetic drug Bleomycin. *Genes Environ.* 28;47(1):7. 2025
11. Iso, T., Suzuki, K., Murata, Y., Hirose, N., Umamo, T., Horibata, K., Sugiyama, K., Hirose, A., Masumura, K. and Matsumoto, M: Lack of in vivo mutagenicity of carbendazim in the liver and glandular stomach of MutaMice, *Genes and Environ.* 46, 7 (2024). <https://doi.org/10.1186/s41021-024-00299-4>
12. Parsons BL, Beal MA, Dearfield KL, Douglas GR, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Kenyon M, Long AS, Lovell D, Lynch AM, Myers MB, Pfuhrer S, Vespa A, Zeller A, Johnson G, White PA. Severity of Effect Considerations Regarding the Use of Mutation as a Toxicological Endpoint for Risk Assessment: A Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Environmental and Molecular Mutagenesis.* Online

- ahead of print, 2024.
13. Furihata C., Suzuki T. Four functional genotoxic marker genes (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) discriminate genotoxic hepatocarcinogens from non-genotoxic hepatocarcinogens and non-genotoxic non-hepatocarcinogens in rat public toxicogenomics data, Open TG-GATEs. *Genes Environ.* 2024; 46: 28.
 14. Hosoi S, Hirose T, Matsumura S, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Suzuki T., Masumura K, Sugiyama K. Effect of sequencing platforms on the sensitivity of chemical mutation detection using Hawk-Seq™. *Genes Environ.* 2024;46:20.
 15. Corton JC, Auerbach SS, Koyama N., Mezencev R., Yauk CL., Suzuki T Review and meta-analysis of gene expression biomarkers predictive of chemical-induced genotoxicity in vivo. *Environ. Mol. Mutagen.* 2024 in press
 16. Froetschl R., Corton JC., Li H., Aubrecht J., Scott S. Auerbach SS., Caiment F., Doktorova TY., Fujita Y., Jennen D., Koyama N., Meier MJ., Mezencev R., Recio L., Suzuki T., Yauk CL. Consensus findings of an IWGT Workshop on using Transcriptomic Biomarkers to Predict Genotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 2024 in press
 17. 築茂由則, 吉田徳幸, 大岡伸通, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 米満研三, 上間匡, 本間正充, 合田幸広, 井上貴雄: 共通ウイルスゲノム RNA を用いた COVID-19 診断用核酸増幅検査薬の一斉性能評価試験. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 2024;55:295-310
 18. Ikeuchi S, Hirose S, Shimada K, Koyama A, Ishida S, Katayama N, Suzuki T, Tokairin A, Tsukamoto M, Tsue Y, Yamaguchi K, Osako H, Hiwatashi S, Chiba Y, Akiyama H, Hayashidani H, Hara-Kudo Y. Isolation of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli from the Surfaces of Beef Carcasses in Slaughterhouses in Japan. *J Food Prot.* 2024; 87:100263.
 19. Kim SH, Lee J, Jang M, Roh SE, Kim S, Lee JH, Seo J, Baek J, Hwang JY, Baek IS, Lee YS, Shigetomi E, Lee CJ, Koizumi S., *Kim SK and *Kim SJ.(2025) Cerebellar Bergmann glia integrate noxious information and modulate nocifensive behaviours. *Nat Neurosci*, doi: 10.1038/s41593-024-01807-z. Online ahead of print (Jan.02)
 20. Kobayashi Y, Sakai K, Tran NQV, Ishimaru K, Sato T, Nakamura Y, Nakagomi D, Tanaka S, Koizumi S and Nakao A.(2024) IL-33 sensitizes mast cells to PIEZO1 stimulation leading to degranulation. *Allergy*, 79, 3517-3520. Doi:10.1111/all.16397
 21. Kubota Y, Shigetomi E, Saito Ko, Shinozaki Y, Kobayashi K, Tanaka M, Bijay P, Tanaka KF, and *Koizumi S. (2024) Establishment and Use of Primary Cultured Astrocytes from Alexander Disease model mice. *Int J Mol Sci*, 25(22), 12100. Doi:10.3390.ijms252212100
 22. Shigetomi E, Suzuki H, Hirayama YJ, Sano F, Yoshihara K, Koga K, Tateoka T, Yoshioka H, Shinozaki Y, Kinouchi H, Tanaka KF, Bito H, Tsuda M and *Koizumi S. (2024) Reactive astrocytes enhance neuronal excitability via IGFBP2: pathological effects of P2Y1 receptor upregulation. *Nat Commun* 15, 6525.
 23. Parajuli B, Koizumi S. Unexpected role of microglia and P2Y12 in the induction of and emergence from anesthesia. *Purinergic Signalling* 20(6) 573-575 2024
 24. Kim SH, Lee J, Jang M, Roh SE, Kim S, Lee JH, Seo J, Baek J, Hwang JY, Baek IS, Lee YS, Shigetomi E, Lee CJ, Koizumi S, Kim SK, Kim SJ. Cerebellar Bergmann glia integrate noxious information and modulate nocifensive behaviors. *Nat Neurosci.* 28(2) 336-345 2025
 25. Hirayama Y, Le NGH, Hashimoto H, Ishii I, Koizumi S. and *Anzai N. (2024) Preconditioning-induced facilitation of lactate release from astrocytes is essential for brain ischemia tolerance. *eNeuro*, 11(4):ENEURO.0494-23.2024. doi:10.1523/ENEURO.0494-23.2024
 26. S.Kakizawa, T.Arasaki, A.Yoshida, A.Sato, Y.Takino, A.shigami, T.Akaike, S.Yanai, S.Endo. *Redox Biology*, 70, 103053 (2024) .
 27. T.Shintani, S.Yanai, A.Kanasaki,T.Iida, S.Endo. *Experimental Gerontology*, 196, 112555 (2024)
- ## 2. 学会発表
1. Shigemoto-Mogami Y., et al., Study about the cell composition of blood brain barrier-microphysiological system (BBB-MPS) for reproducing pathological conditions. *MPSWS 2024*, Seattle, 6. 2024
 2. Shigemoto-Mogami Y., et al., Three BBB developmental stages determined by the configurations of brain microvasculature, astrocytes, and microglia. *Neuro2024*, 福岡, 7. 2024
 3. Takahashi K., Quan Z., Awakawa T. Shigemoto-Mogami Y., Ohwada T., Abe I., Sato K. Search for meroterpenoids that inhibit microglia activation. *APPW2025*, 幕張, 3. 2025
 4. 高橋 華奈子、淡川 孝義、Zhiyang Quan、最上由香里、大和田 智彦、阿部 郁朗、佐藤 薫、ミクログリア活性化抑制作用を持つ超天然化合物メロテルペノイドの探索. *日本薬学会第 145 年会 (福岡)* 3. 2025
 5. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一 : Detection of genotoxic reactions by analyzing DNA damage response using chromatin immunoprecipitation. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7)
 6. 磯貴子, 村田康允, 広瀬望, 馬野高昭, 津田雅貴, 堀端克良, 杉山圭一, 増村健一, 松本真理子 : In vivo mutagenicity evaluation of cobalt acetate tetrahydrate. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7)
 7. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一 : クロマチン免疫沈降法を利用したアルキル化剤誘発遺伝毒性反応の検出. 第 83 回日本癌学会学術総会 (2024.9)
 8. 堀端克良, 安東朋子, 吉田愛海, 杉山圭一 : 遺伝情報発現に付随する突然変異誘発. *日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会* (2024.12)
 9. 松本真理子, 磯貴子, 馬野高昭, 村田康允, 広瀬望, 増村健一, 堀端克良, 杉山圭一 : トルエンジ

- イソシアネート経口投与による MutaMouse 肝臓における変異原性. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 (2024.12)
10. 羽倉昌志, 加藤雅之, 川上久美子, 皿田巳子, 須井哉, 杉山圭一, 堀端克良, 峯川和之, 山本美佳, 山田雅巳: TA100 株の全ゲノム解析: 遺伝子変異のロット間比較 (BMS pilot study). 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 (2024.12)
 11. 増村健一, 安東朋子, 堀端克良, 石井雄二, 杉山圭一: アクリルアミドが誘発する生殖系列突然変異の解析. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 (2024.12)
 12. 伊澤和輝. ecNGS ってなんだ? 日本環境変異原ゲノム学会 第 84 回 MMS 研究会, 2024 年 6 月 (東京)
 13. 伊澤 和輝, 津田 雅貴, 鈴木 孝昌, 本間 正充, 杉山 圭一. ラット試料を用いた ecNGS による in vivo 変異原性評価法の確立に向けた研究. 第 47 回 日本分子生物学会 2024 年 11 月 27 日 (福岡)
 14. 伊澤和輝, 津田雅貴, 鈴木孝昌, 本間正充, 杉山圭一, NGS を用いたラット試験試料からの in vivo 変異原性データ取得への取り組み, 第 52 回構造活性関連シンポジウム, 2024 年 12 月 (神奈川)
 15. 伊澤和輝, データ解析におけるドメイン知識の重要性: ecNGS 解析編, 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 Potential for Computational Genotoxicity シンポジウム, 2024 年 12 月 (岡山)
 16. 伊澤和輝 データ解析におけるドメイン知識の重要性: ecNGS 解析編日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山県 (2024.12)
 17. 鈴木孝昌 様々な EC-NGS 法の特徴 日本環境変異原ゲノム学会第 84 回 MMS 研究会, 東京都 (2024. 6)
 18. 鈴木孝昌 Error-corrected next generation sequencing (ecNGS)の現状 第 51 回日本毒性学会学術年会 福岡市 (2024.7)
 19. 鈴木孝昌, 尤馨悦, 伊澤和輝, 津田雅貴, 本間正充, 欒洋, 杉山圭一. PECC-Seq 法の開発から学ぶエラー修正 NGS(ecNGS)法の残存エラーの要因 第 83 回日本癌学会学術総会, 福岡市 (2024.9)
 20. 鈴木孝昌, 西川可穂子. 河川水のメタゲノム解析による細菌叢と薬剤耐性遺伝子の探索 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
 21. 鈴木孝昌, 杉山圭一. ナノポアシーケンサーを用いた簡便迅速な DNA メチル化解析手法の開発 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
 22. 降旗千恵, 鈴木孝昌. In vivo トキシコゲノミクス試験に有用な 4 つの遺伝毒性マーカー遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, Cdkn1a) 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
 23. 東航平, 鈴木孝昌, 青木康展, 山田雅巳. 魚類腸内細菌叢解析を用いた水環境中の界面活性剤のモニタリングに関する研究 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
 24. Susuki T. "Error-corrected next-generation sequencing (NGS)" as an ultimate tool for genetic toxicology 第 47 回インド環境変異原学会年会 アンナマライ/インド (2025.1)
 25. Shigemoto-Mogami Y., et al., Study about the cell composition of blood brain barrier-microphysiological system (BBB-MPS) for reproducing pathological conditions. MPSWS 2024, Seattle, 6. 2024
 26. Shigemoto-Mogami Y., et al., Three BBB developmental stages determined by the configurations of brain microvasculature, astrocytes, and microglia. Neuro2024, 福岡, 7. 2024
 27. Koizumi S, Frontiers in glial disease research. (シンポジウム), NEURO2024, 2024 年 7 月 24 日, 福岡 (大会長)
 28. Koizumi S. Control of Alexander disease by microglia. (招待) 28th TMIIMS International Symposium The Tokyo Glia Symposium Glial Cells in Health and Disease.2024 年 7 月 29 日, 東京
 29. 小泉修一, ミクログリアに制御される脳 (招待), 生化学若い研究者の会第 64 回生命科学夏の学校, 2024 年 8 月 31 日, オンライン
 30. 小泉修一, アストロサイト病の分子病態と制御 (招待), 第 3 回北海道大学遺伝子病制御研究所・生理学研究所ジョイントシンポジウム, 2024 年 9 月 3 日, 北海道大学
 31. Koizumi S. Molecular pathogenesis of Alexander disease. ASPIRE-GLIA Symposium. (口頭) 2024 年 9 月 14 日, Lausanne, Switzerland
 32. 小泉修一, グリア細胞を入れ替えて脳を変える (口頭), グリア細胞展特別セミナー, 2024 年 9 月 28 日, 甲府
 33. 小泉修一, グリア細胞の異常と疼痛 (招待), 第 28 回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2024 年 10 月 12 日, 東京
 34. Koizumi S. Myelin phagocytosis by astrocytes in Alexander disease model. (招待), The National Institute for Physiological Sciences The 54th International Symposium.2024 年 10 月 23 日, 岡崎
 35. 小泉修一, てんかん原性とグリア細胞 (口頭), 第 54 回日本臨床神経生理学会, 2024 年 10 月 25 日, 札幌
 36. 小泉修一, ミクログリア置換による脳機能の制御 (招待), 第 7 回新潟大学共用設備基盤センター (CCRF) シンポジウム, 2024 年 10 月 31 日, 新潟
 37. 柳井修一. 老化研究における行動科学. 日本行動科学学会第 39 回ウィンターカンファレンス (2024.2.18-20)
 38. 柳井修一・高瀬堅吉. 正しく研究するとは, 正しく生きるとは~杉岡先生が残したもの. 日本

- 行動科学学会第 39 回ウインターカンファレンス (2024.2.18-20)
39. 柳井修一・新崎智子・遠藤昌吾. オスの C57BL/6J マウスにおける行動学的・機能的老化. 第 71 回日本実験動物学会総会 (2024.5.29-31)
40. S. Yanai, T. Arasaki, S. Endo. Assessment of physical and cognitive decline in aging mouse model. 第 47 回日本基礎老化学会大会 (2024.6.15-16)
41. J. Chen, Y. Takino, S. Yanai, A. Ishigami, Y. Knodo. Effect of dietary protein ratio on lipid metabolism in the mouse liver. 第 47 回日本基礎老化学会大会 (2024.6.15-16)
42. R. Inoue, S. Yanai, H. Nishimune. Coenzyme Q10 supplementation improves gait in aged mice. Neuro 2024 (2024.7.24-27)
43. 柿澤昌・新崎智子・赤池孝章・柳井修一・遠藤昌吾. 活性酸素による小脳依存的運動学習及び小脳長期抑圧の制御. Neuro 2024 (2024.7.24-27)
44. S. Kakizawa, T. Arasaki, T. Akaike, S. Yanai, S. Endo. Essential roles of ROS in long-term synaptic plasticity in the cerebellum. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Molecular Mechanisms of Neuronal Connectivity”(2024.9.10-14)
45. S. Kakizawa, S. Yanai, S. Endo. Essential roles of ROS – 8-nitro-cGMP signals in long-term memory of motor learning and cerebellar synaptic plasticity. Neuroscience 2024 (2024.10.5-9)
- G. 知財財産権の出願・登録状況**
(予定を含む。)
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
- 現在のところ該当なし。

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 年度成果報告書

分担研究課題：神経細胞、ミクログリアの採材法開発と細胞老化指標の明確化

分担研究者：最上 由香里 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター
薬理部第一室 主任研究官

評価担当者：高橋 華奈子、最上 由香里

研究要旨

超高齢化社会をむかえる本邦において、健康長寿社会の実現を見据えた化学物質管理が急務となっている。近年、加齢に伴って生じる脳細胞の体細胞変異やエピジェネティクス異常が、環境要因によって増悪するという新たな健康被害が懸念されている。このような毒性を評価するために、細胞老化との関連性を踏まえた *in vitro* ゲノム毒性評価法の開発が重要である。本研究では、正常老齢マウスおよび老化促進マウス（Senescence-associated mouse prone 8:SAMP8）より脳細胞を単離し、ゲノム毒性評価を行う。脳細胞のうち、細胞老化モデル細胞として、由来や寿命が異なる神経細胞とミクログリアを選定した。本年度は、動物実験の始動と、細胞採材プロトコルの確立を行った。老齢マウスの脳組織より、再現性良く神経細胞、ミクログリアを採材するために、Miltenyi Biotec 社の MACS Sample Preparation 法を導入し、脳組織の分散、単一細胞の単離を行った。回収した神経細胞、ミクログリアの細胞数、生存率、純度は MACS Quant Analyzer10 で検証した。さらに、回収した神経細胞、ミクログリアの培養条件を確立し、免疫染色による細胞性状の確認を行った。その結果、老齢マウスおよび若齢マウスの脳より、神経細胞、ミクログリアを回収出来ることが示された。今回確立した細胞採材プロトコルを用いて、老齢マウスに加えて、SAMP8、SAM Resistant (SAMR) より神経細胞、ミクログリアを単離し、ゲノム毒性評価のモデル細胞として供給を開始する。

A. 研究目的

本邦において、高齢化率は現在約 23%、2030 年には 32%と予想されており、かつてどの国も経験したことの無い「超高齢社会」を迎えつつある。このような超高齢社会の到来を目前に控え、日本国民が健康で長生きできる「健康長寿社会」を目指した化学物質管理が急務となっている。加齢に伴って生じる脳細胞の体細胞変異やエピジェネティクス異常は、環境要因や化学物質暴露によって増悪する可能性が懸念されており、このような新たな健康被害を評価可能な *in vitro* ゲノム毒性評価法の開発が期待されている。

脳は、神経細胞と、その十倍以上の数のグリア細胞、脈管系細胞など複数の細胞で構成されているヘテロな臓器である。神経細胞は、化学情報を電気シグナルに変換し、別の細胞へ伝達することが出来る細胞である。複雑なネットワーク構造を形成し、電気シグナルを情報として伝達することで、感覚、運動、思考といった高度な脳機能を維持している。また、神経細胞の由来は、外胚葉系の神経幹細胞であり、分化後は分裂をしない長寿命な細胞である。一方、脳の免疫担当細胞として知られるミクログリアは、食食能、移動能、抗原提示能、生理活性物質の産生など、多彩な生理機能を有し、脳の恒常性を維持している。ミクログリアの由来は内胚葉系の卵黄嚢マクロファージであり、マウスでは、胎生9日より脳内に存在している。また、比較的長寿命な細胞であり、自己複製能に優れ、生涯にわたって細胞数を維持している。本研究では、細胞の由来や寿命が極めて異なる神経細胞とミクログリアをモデル細

胞として選定し、若齢マウス、老齢マウスの脳から採材する手法の確立を行った。

研究方法

試薬

以下の試薬を購入し、実験に用いた。Adult Brain Dissociation kit(130-107-677)、C-Tube(130-093-237)、Adult Neuron Isolation Kit (130-126-602)、Microglia Micro Beads(130-093-636)、Anti-Biotin-APC (130-113-850)、Viability Fixable Dye 405/452 (130-130-403)、Transcription Factor Staining Buffer set(130-122-981)、Anti-CD45-FITC (130-110-769)、Anti-CD11b-PE (130-113-806)、Inside Stain kit(130-090-477)、MACS Neuro Medium (130-093-570)、MACS NeuroBrew-21 (130-093-566)はMiltenyi Biotec社より入手した。Anti-NeuN-AF488 (ab190195)、Anti-MAP2 (ab5392)は、Abcam社より入手した。Anti-TMEM119-CoraLite647 (CL647-27585)は、Proteitech社より入手した。Anti-Tuj1 (MMS-435P)はCovance社より、Anti-iNos (#13120)はCST社より、Anti-Ibal (HS-234308)はSynaptic systems社より入手した。Poly-d-Lysine (P6407)、Laminin (L2020)、Poly-L-Lysine (P9155)はSigma-Ardlich社より入手した。牛胎児血清 (26140-079)、ペニシリン-ストレプトマイシン (15140-122)、ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB (15240-062)、DMEM (11965-0921)はGibco社より入手した。BDNF (450-02)、MCSF (315-02)、TGF β (100-21)はPepro tech社より入手した。Hoechst (346-07951)はDajindo社より、8 well chambered coverslip (80826)はibidi社より入手した。

実験動物

若齢マウス (C57BL/NcrもしくはC57BL/6J 3ヶ月齢, ♂), 老齢マウス (C57BL/NcrもしくはC57BL/6J 24ヶ月齢, ♂) は東京都健康長寿医療センター研究所より入手した。

脳組織分取 (Fig. 1)

マウスを深麻酔下で心灌流により脱血し、迅速に脳を摘出した後、顕微鏡下で前脳領域を採取した。

細胞分散・単離実験 (Fig. 1)

脳サンプルの細胞分散はAdult Brain Dissociation kitのManualに従い、Gentle MACS Dissociator (Miltenyi Biotec社) を用いて分散した。下記に簡単に方法を記す。

脳サンプルの重量を計測し、分散バッファの入ったホモジネーターチューブ (C-Tube) に浸した後、チューブ内で5mm角にカットした。脳サンプルをGentle MACS Dissociatorを用いて単一細胞に分散し、デブリ除去を行った。精製した脳単一細胞は、細胞特異的磁気ビーズ抗体を用いたMACS法により神経細胞 (Adult Neuron Isolation Kit) とミクログリア (Microglia Micro Beads) に単離した。

FACS解析 (Fig. 2, 3)

単離した神経細胞、ミクログリアの純度、細胞数、生細胞の割合をMACS Quant Analyser10 (Miltenyi Biotec社) を用いて解析した。神経細胞は、Anti-Biotin-APC、Anti-NeuN-AF488、Viobility Fixable Dye 405/452を用い、Transcription Factor Staining Buffer setを用いて、細胞外、細胞核をラベルした。ミクログリアは、Anti-CD45-FITC、Anti-CD11b-PE、Anti-TMEM119-CoraLite647、Viobility Fixable Dye 405/452を用い、Inside Stain kitを用いて細胞外、細胞内をラベルした。

神経細胞培養

単離した神経細胞を、Poly-d-Lysine (50 μ g/ml、3時間、室温) コート 8 well chambered coverslipに播種した。10 %牛胎児血清、0.1 %ペニシリン-ストレプトマイシン含有MACS Neuro Medium基礎培地に、用事MACS NeuroBrew-21 (2 %) 及び脳由来神経栄養因子 (BDNF、0.02 μ g/ml) を添加した培地を用いた。播種の際には、さらにLaminin (10 μ g/ml) を添加した培地を用いた。細胞懸濁液 (5 \times 10⁴細胞/5 μ L) をwellの中心にdrop-applyして播種した。

ミクログリア培養

単離したミクログリアを、Poly-L-Lysine (10 μ g/ml、3時間、室温) コート 8 well chambered coverslipに播種した。10 %牛胎児血清、1 %ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB含有DMEM基礎培地に、用事マクロファージコロニー刺激因子 (MCSF、10 ng/ml) 及びトランスフォーミング増殖因子 β (TGF β 1、50 ng/ml) を添加した培地を用いた。播種密度は、2 \times 10⁴細胞/cm²とした。

免疫染色 (Fig. 4)

神経細胞用培養プロトコル用いて14日間培養した細胞標本を、早期神経分化マーカーTuj1 (1:500)、神経細胞樹状突起・成熟神経細胞マーカーMAP2 (1:5000) 及びHoechst (1:200) の3重染色を行った。ミクログリア用培養プロトコル用いて7日間培養した細胞標本を、炎症応答活性化マーカーである誘導型一酸化窒素合成酵素iNos (1:200)、ミクログリアマーカーIba1 (1:500) 及びHoechstの3重染色を行った。免疫染色した標本は、共焦点レーザー顕微鏡システムA1R (Nikon) を用いて撮影を行った。

B. 研究結果

若齢・老齢マウスの前脳領域由来 神経細胞、ミクログリアの採材方法の確立

若齢・老齢マウスより神経細胞、ミクログリアを再現性よく単離回収するためMiltenyi Biotec社のMACS Sample Preparation法を導入した (Fig. 1)。C57BL/Ncr3ヶ月齢、24ヶ月齢♂マウスは深麻酔下において5分間PBSを心灌流し脱血した。脱血後、脳組織を摘出し、顕微鏡下において前脳領域を分取した。分取した脳サンプルは計量後、ホモジネーターチューブに分取し、Neural Tissue Dissociation Kitsの分散液中において5mm画にカットした。その後、Gentle MACS Dissociatorにより、酵素反応および機械分散によって緩やかにシングル細胞へと分散した。デブリ除去したシングル細胞溶液は、2等分し、それぞれMACS法によって神経細胞濃縮液 (Adult Neuron Isolation Kit)、ミクログリア (Microglia Micro Beads) を単離した。神経細胞濃縮液は、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、血管内皮細胞、線維芽細胞を除去したネガティブセレクトションとして、ミクログリアはCD11b陽性細胞のポジティブセレクトションとして、MACS法により回収した。ミクログリアは純度を上げるため、磁気カラム処理を2回行った。回収後の神経細胞、ミクログリアの細胞数、生存率、純度はMACS Quant Analyser10で検証した (Fig. 1)。

Fig. 2 は、FACSによる神経細胞のポピュレーション解析の結果を示している。若齢マウス (A, a) は平均体重が23.43 g、平均前脳重量が0.410 g、老齢マウス (B, a) では、平均体重が41.98 g、平均前脳重量が0.408 gであり、若齢マウスと比較して老齢マウスでは、体重が2倍になっているにもかかわらず、前脳の大きさはほとんど変化していないことが示された。単離した神経細胞溶液をFig. 1で示す特異的抗体で染色後、シングル細胞領域で評価した結果、若齢マウス (A, b, c) では細胞数が平均細胞数8.9 \times 10⁴、純度は95.14%、細胞生存率89.14%であること、またそのうち成熟神経細胞のマーカーとして知られるNeuN陽性細胞の平均細胞数は7.5 \times 10⁴、純度は84.3%であることが示された。一方、老齢マウス (B, b, c) では細胞数が平均細胞数5.7 \times 10⁴、純度は96.19%、細胞生存率99.14%であること、またそのうちNeuN陽性平均細胞数は4.3 \times 10⁴、純度は75.14%であることが示された。

Fig. 3 は、FACSによるミクログリアのポピュレーション解析の結果を示している。単離したミクログリアをFig. 1で示す特異的抗体で染色後、シングル細胞領域で評価した結果、若齢マウス (A, a, b) では細胞数が平均細胞数4.12 \times 10⁴、純度は92.15%、細胞生存率98.33%であること、またそのうちミクログリア特異的マーカーとして知られるTMEM119陽性細胞の平均細胞数は3.53 \times 10⁴、純度は85.78%であることが示された。一方、老齢マウス (B, a, b) では細胞数が平均細胞数3.02 \times 10⁴、純度は88.02%、細胞生存率98.68%であること、またそのうちTMEM119陽性平均細胞数は2.34 \times 10⁴、純度は77.34%であることが示された。

若齢・老齢マウスより採材した神経細胞、ミクログリアの長期培養条件の確立と免疫染色法による細胞性状の確認

若齢マウスおよび老齢マウス前脳から単離した神経細胞、ミクログリアの培養条件の整備し、免疫染色による細胞性状の確認を行った (Fig. 4)。若

齢マウス、老齢マウス由来神経細胞を14日間培養した結果、両群由来細胞において、複数本のTuj1(+)/MAP2(+)神経突起を有する細胞を確認した(Fig. 4A)。また、培養後の老齢マウス由来神経細胞の生存細胞数は、若齢マウス群と比較して顕著に低かった(data not shown)。

若齢マウス、老齢マウス由来ミクログリアを7日間培養した結果、両群由来細胞においてミクログリアマーカーであるIba1が発現していることを確認した。老齢マウス由来ミクログリアでは、炎症応答活性化マーカーであるiNosの発現が高く、細胞体内に複数の大きなドット状のシグナルが観察された(Fig. 4B)。また、培養後のミクログリアの生存細胞数は、若齢、老齢マウス間で顕著な相違は認められなかった(data not shown)。

C. 考察

本研究では、若齢マウスとして3ヶ月齢、正常老齢マウスとして24ヶ月齢のC57BL/NCrマウス♂を用いた。若齢マウスと比較して老齢マウスでは、体重が2倍になっているにもかかわらず、前脳の大きさはほとんど変化していないこと(Fig. 2)、採材細胞数も神経細胞、ミクログリア共に有意な変化はないことが示された。正常老化モデル細胞の回収動物として、適した月齢であると考えられた。

今回採取した神経細胞の細胞ポピュレーションを解析した結果、若齢マウス、老齢マウスいずれにおいても、純度95%以上、生存率90%以上の細胞として、平均細胞数 $5.0\text{--}8.0 \times 10^4$ 程度の細胞が回収できることが示された。回収した神経細胞は、脳細胞集団より、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、血管内皮細胞、線維芽細胞を除いた神経細胞濃縮液であり、神経前駆細胞、グリア前駆細胞、その他の脳細胞などが含まれる可能性がある。しかしながら、回収した神経細胞濃縮液の約8割がNeuN陽性であることが示され、多くの集団が成熟した神経細胞であることが明らかになった。また、NeuN陽性細胞の割合も若齢マウス老齢マウスにおいて有意な変化は確認できなかったことから、3か月齢、また24ヶ月齢のマウスの脳では、神経細胞の多くが、成熟分化している可能性が示された。また、今回の採材神経細胞は、若齢マウスと比較して老齢マウスでは平均細胞数が少なかったが、3例中1例の老齢マウスにおいて、ホモジネートの際、脳サンプルの一部が懸濁できておらず、分散が出来ていなかったことを確認している。今後、ホモジネート時の手技を改善する予定である。

さらに、我々は、採材神経細胞の培養プロトコルを整備した。14日間培養後の採材神経細胞では、複数本のTuj1(+)/MAP2(+)神経突起を観察することができ、本細胞が神経特異的マーカー蛋白質と形態を有した神経細胞であることが示された。また、若齢マウス、老齢マウス由来神経細胞の生存率は、細胞単離直後のFACS解析では、共に高い生存率を示したが、培養過程で細胞死が生じ、培養14日目では、若齢マウス群と比較して老齢マウス群では、顕著に生存率が低下していた(Data not shown)。老齢マウス由来の神経細胞は、細胞死を誘発しやすいこと、培養プロトコルの工夫が必要であることが示された。

一方、今回採取したミクログリアの細胞ポピュレーションを解析した結果、若齢マウス、老齢マウスいずれにおいても、ミクログリアは純度90%以上、

生存率95%以上の細胞として、平均細胞数 $3.0\text{--}4.0 \times 10^4$ 程度の細胞が回収できることが示された。回収したミクログリアは、若齢および老齢マウスの脳細胞集団より単離した、CD11b陽性細胞である。CD11bは単球やマクrophageに発現する細胞表面マーカーであり、脳ではミクログリアのみ発現することが明らかになっている。本実験ではマウスを心灌流により脱血し、脳細胞を精製したため、抹消由来血球細胞が混入する可能性はほとんどないと考えられる。実際、回収したCD11b陽性細胞の約8割がTMEM119陽性であることが示され、多くの集団がミクログリアであることが明らかになった。また、基礎検討の結果から、ミクログリアの単離実験は磁気カラム処理1回では細胞の純度が60%程度であった。今回、磁気カラム処理を2回行うことで、90%以上の純度のミクログリアを回収することができた。今後、ミクログリアの単離プロトコルは、2回の磁気カラム処理で実施する。

さらに、我々は、採材ミクログリアの培養プロトコルを整備した。7日間培養後の採材ミクログリアでは、Iba1陽性のアメンバー状の形態の細胞が観察できており、本細胞がミクログリア特異的マーカー蛋白質と形態を有したミクログリアであることが示された。また、培養過程で細胞死が生じたものの、培養7日目の若齢マウス、老齢マウス由来ミクログリアの生存率に違いは認められなかった(Data not shown)。また、老齢マウス由来のミクログリアは、炎症応答活性化マーカーであるiNosの発現が高いことが示された。本結果は、老齢マウスの脳内では、炎症活性型のミクログリアが増大するという報告と一致しており、培養後のミクログリアが生体のミクログリアの性質を維持している可能性が示された。

D. 結論

若齢マウスおよび老齢マウスの脳より、再現性良く神経細胞、ミクログリアを採材する方法を確立することが出来た。また、採材神経細胞、ミクログリアの培養プロトコルも整備した。本細胞サンプルの老化度評価、ゲノム毒性評価を開始し、in vivoの結果と比較検証する。

E. 参考文献

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakayama-Kitamura K, Shigemoto-Mogami Y, Piantino M, Naka Y, Yamada A, Kitano S, Furihata T, Matsusaki M, Sato K. *Biomedicines*. 2024, 12 (11) 10.3390/biomedicines12112500.

2. Shigemoto-Mogami Y, Nakayama-Kitamura K, Sato K. *Front Neuroanat*. 2024, 18:1438190.

2. 学会発表

1. Shigemoto-Mogami Y, et al., Study about the cell composition of blood brain barrier-microphysiological system (BBB-MPS)

for reproducing pathological conditions.
MPSWS 2024, Seattle, 6. 2024

第145年会 (福岡) 3. 2025

2. Shigemoto-Mogami Y., et al., Three BBB developmental stages determined by the configurations of brain microvasculature, astrocytes, and microglia. Neuro2024, 福岡, 7. 2024
3. Takahashi K., Quan Z., Awakawa T. Shigemoto-Mogami Y., Ohwada T., Abe I., Sato K. Search for meroterpenoids that inhibit microglia activation. APPW2025, 幕張, 3. 2025
4. 高橋 華奈子、淡川 孝義、Zhiyang Quan、最上 由香里、大和田 智彦、阿部 郁朗、佐藤 薫. ミクログリア活性化抑制作用を持つ超天然化合物メロテルペノイドの探索. 日本薬学会

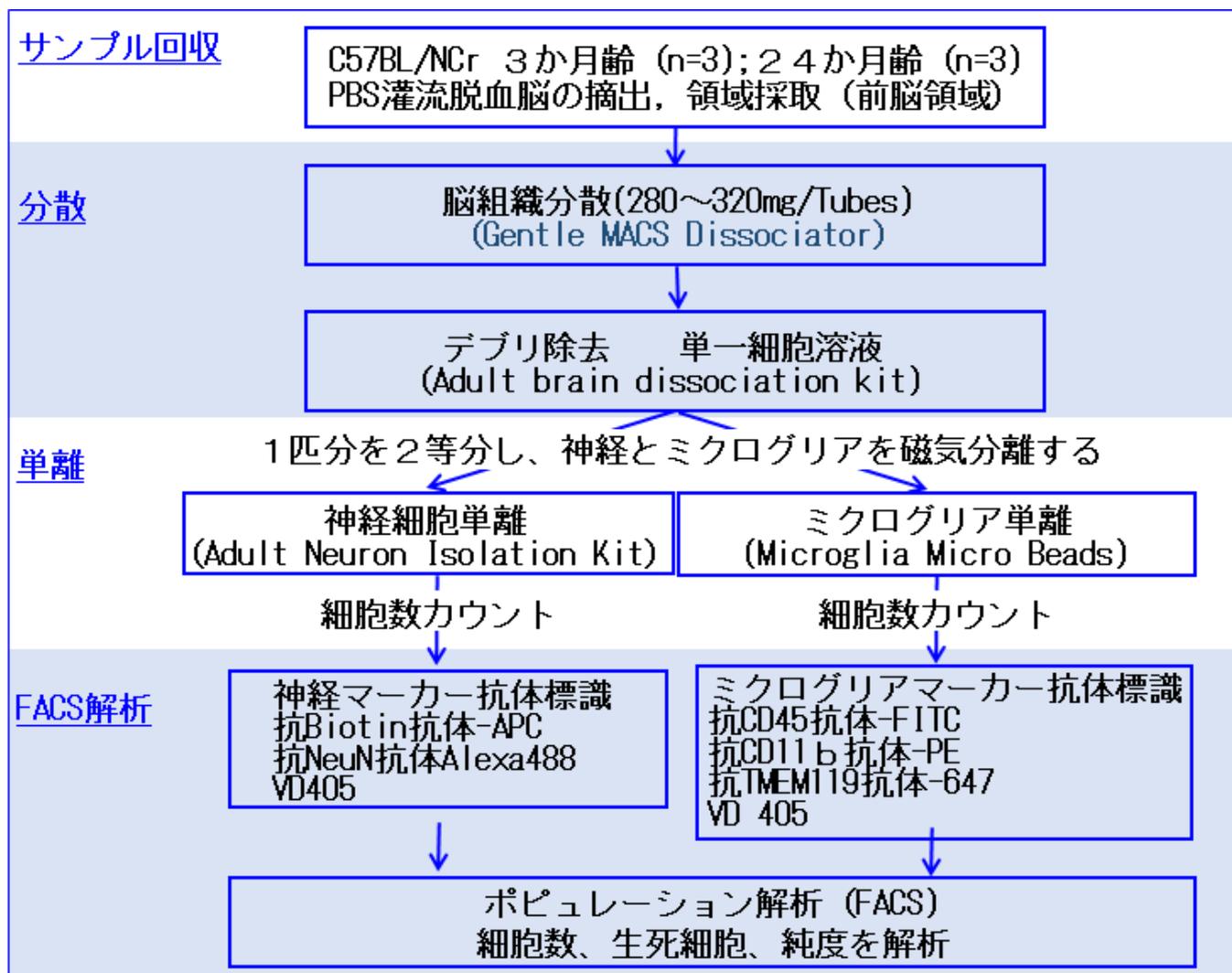


Fig.1 実験フローチャート

脳サンプルの回収、分散、単離、FACS解析の過程について、一連の実験プロトコルをフローチャートとしてまとめた。

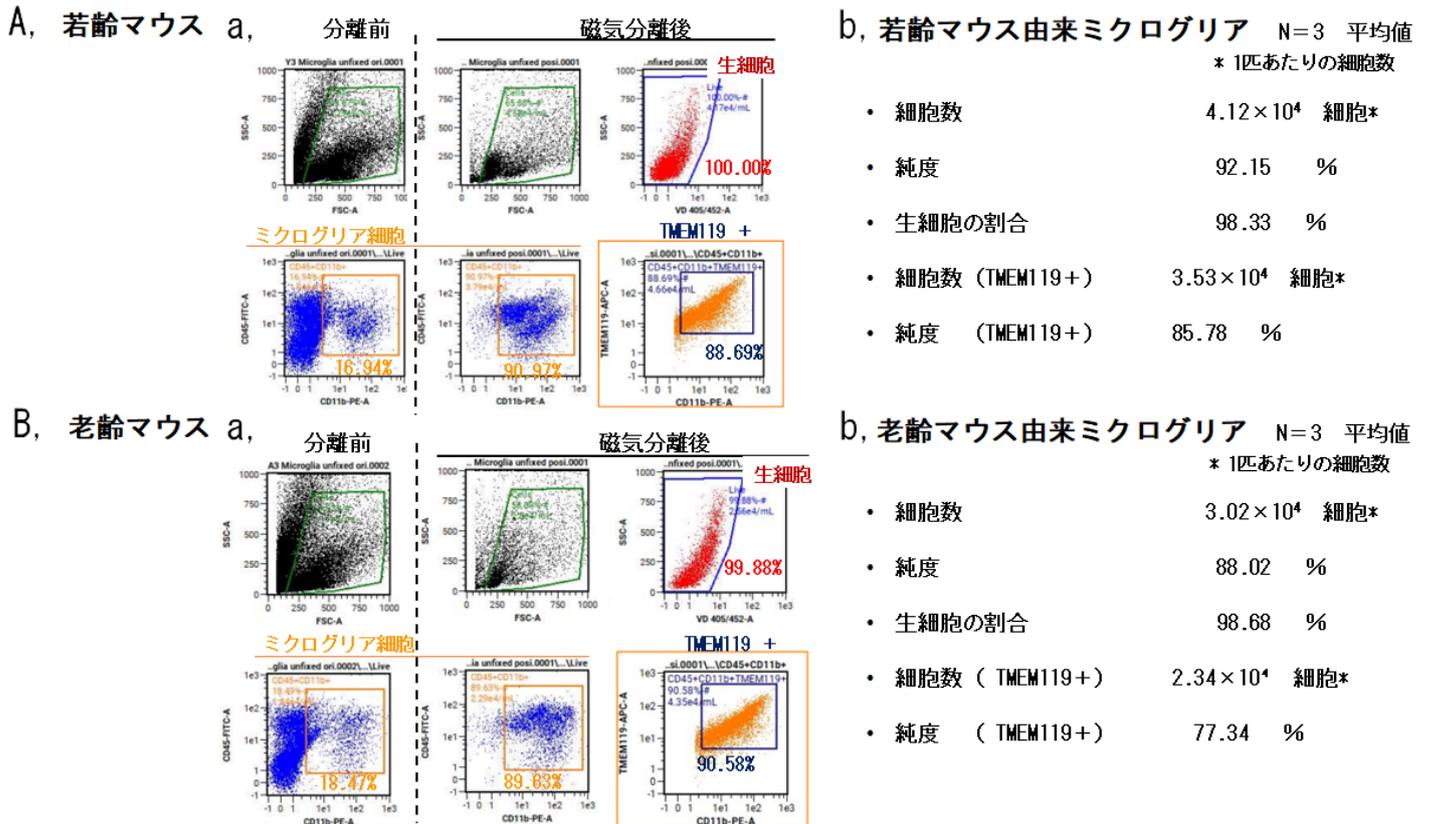


Fig. 3 若齢マウス、老齢マウスより単離したマイクログリアのFACS解析

- A. a 若齢マウスの FACS 解析の結果を示す。CD11b 陽性のマイクログリアは、分離前は 16.94% であるが、磁気分離後は 90.97% を示した。そのうち生細胞は 100.0%、TMEM119 陽性細胞は 88.69% であった。b 若齢マウス 1 匹から採取される神経細胞の細胞数、純度、生細胞の割合、TMEM119 陽性細胞数、TMEM119 陽性細胞純度を示している。データは 3 匹の平均値を記す。
- B. a 老齢マウスの FACS 解析の結果を示す。CD11b 陽性のマイクログリアは、分離前は 18.47% であるが、磁気分離後は 89.63% を示した。そのうち生細胞は 99.88%、TMEM119 陽性細胞は 90.58% であった。b 老齢マウス 1 匹から採取される神経細胞の細胞数、純度、生細胞の割合、TMEM119 陽性細胞数、TMEM119 陽性細胞純度を示している。データは 3 匹の平均値を記す。

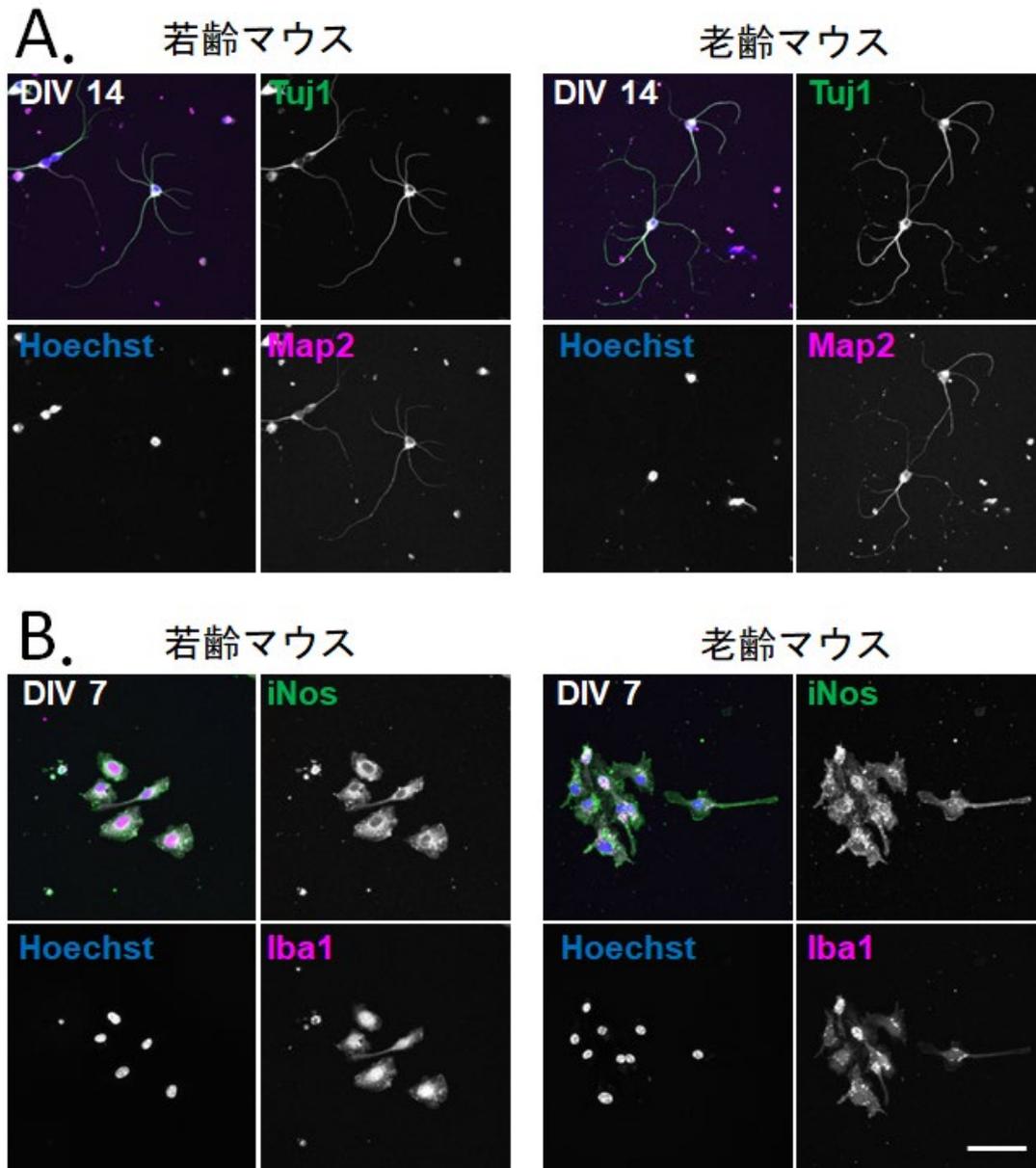


Fig. 4 若齢マウス、老齢マウスより単離，培養した神経細胞，ミクログリアの免疫染色画像

- A. 神経細胞培養プロトコルにて14日間培養した細胞標本の免疫染色画像。緑は早期神経分化マーカーTuj1、マゼンタは神経細胞樹状突起・成熟神経細胞マーカーMap2、青は核マーカーHoechstを示す。左：若齢マウス由来、右：老齢マウス由来。
- B. ミクログリア培養プロトコルにて7日間培養した細胞標本の免疫染色画像。緑は炎症応答活性化マーカーである誘導型一酸化窒素合成酵素iNos、マゼンタはミクログリアマーカーIba1、青は核マーカーHoechstを示す。左：若齢マウス由来、右：老齢マウス由来。
Scale bar=50 μ m。

令和6年度 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

化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および *in vitro* リスク評価法開発のため
の研究

分担研究項目：転写に関連した突然変異生成の解析

研究分担者 堀端 克良 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部

研究分担者 杉山 圭一 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部

研究要旨

突然変異の生成とDNA複製には密接な相関関係があり、神経系などの細胞分裂がほとんど起きないサイレントな組織ではDNA複製の頻度も少なく、突然変異は生じにくいとされているが、実際にはそういったサイレントな組織・細胞でも突然変異やがんが生じる。DNA複製以外でDNAに直接影響を与える細胞内機能は遺伝情報の発現とその中心的機構である転写である。本研究ではサイレントな組織・細胞での突然変異誘発メカニズムとして、“転写に関連した突然変異生成” (transcription-associated mutagenesis; TAM)に着目し、これまでに研究分担者が樹立しているCHO系細胞をベースとしたTAM解析系（CHO/TAM解析系）を用いて、転写制御下において化学物質が介在する突然変異誘発にTAMが与える影響を明らかにすることを目的とする。

一般的に突然変異誘発にはDNA複製が主に関連することが知られており、DNA複製が活発に行われている場合、TAMの詳細を解析することが困難となる。そこで、初年度である今年度は、CHO/TAM解析系においてDNA複製の影響を抑制する実験条件を明らかにするため、CHO/TAM解析系での細胞分裂活性抑制条件を検討した。一般的な培養細胞では接触阻害や無血清下により細胞分裂活性が抑制されることが知られていることから、これらの条件下でのCHO/TAM解析系での細胞分裂活性を解析するとともに、CDK阻害剤等の処理下での細胞分裂活性抑制条件を検討した。その結果、CHO/TAM解析系においては接触阻害や無血清下では細胞分裂活性がほとんど抑制されないが、CDK阻害剤等の処理下では細胞分裂活性が抑制される実験条件を明らかにした。

A. 研究目的

DNA損傷が修復されないままDNA複製が起こることで突然変異が誘発される。すなわち、DNA複製と突然変異生成には密接な正の相関関係があり、活発に細胞分裂する組織ではDNA複製が盛んであり突然変異は生じやすいが、神経系のような細胞分裂が起きないか、ほとんど起きない組織ではDNA複製の頻度も少なく突然変異は生じにくいとされている。しかしながら、実際にはサイレントな組織や細胞でも突然変異やがんが生じる。この事実は、細胞分裂とそれに付随するDNA複製には依らない、これまで

に知られていない突然変異誘発メカニズムの存在を示唆する。

DNA複製以外でDNAに直接関わる主な細胞内機能は、DNA上の遺伝情報を読み出す機能である転写である。この転写の際に様々な事象が生じて突然変異が誘発される、“転写に関連した突然変異生成” (transcription-associated mutagenesis; TAM)の存在が指摘されており、実際に酵母を用いた研究からDNA topoisomerase IがTAMに関与する可能性が示唆されていることに加え、TAMは高度に転写が行われているtRNA遺伝子内およびその周囲の配列変動パターン

別添 3

の重要な決定要因であることも報告されている。

その一方で、最近では化学物質等についても細胞分裂終了後の体細胞にDNA突然変異を引き起こすことが明らかとなっているが、その詳細なメカニズム等は不明である。そこで、本研究ではサイレントな組織・細胞での化学物質による突然変異誘発メカニズムとして、TAMに着目し、これまでに研究分担者が樹立しているCHO系細胞をベースとしたTAM解析系(CHO/TAM解析系)を用いて、転写制御下において化学物質が介在する突然変異誘発にTAMが与える影響を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

本研究では、これまでに研究分担者が樹立しているCHO/TAM解析系で用いるCHO-KTG5細胞株を用いる。この細胞株は、突然変異解析の標的遺伝子である大腸菌*gpt*遺伝子のプロモーターからターミネーターを含んだ*gpt*カセットを利用して作成したλファージDNAコンストラクト(図1)をClontech社のCHO Tet-On 3G細胞に安定に導入して作成したものである。このλファージDNAコンストラクトは、Tetプロモーター(*P_{TRE3G}*)下流に標的遺伝子領域である*gpt*カセットが挿入されており、Tet-ON/OFFにより自在に*gpt*カセット上を転写装置が通るように転写反応を制御する(図2)。その後、細胞ゲノムDNA中のファージDNA領域を*in vitro* packagingでファージとして回収し、*cre*組換え酵素を発現する大腸菌に感染させて菌内においてプラスミド化し、細胞内のTAMで生じた*gpt*カセット上の突然変異の表現型と遺伝子型を大腸菌で解析する。

上記CHO-KTG5細胞株を、5%FBS含有Ham's F-12培地および100 mm x 20 mm 細胞培養用ディッシュを用いて培養表面積の40~50%を占めるように播種し、定着後に5%FBS含有Ham's F-12培地または無血清Ham's F-12培地に交換して終夜培養(約16時間)した後、TC10全自動セルカウンター

(BIO-RAD)を用いて細胞濃度を計測した。その結果、血清の有無による細胞数の変化は見られなかった(data not shown)。引き続き、CHO-KTG5細胞株を、5%FBS含有Ham's F-12培地および100 mm x 20 mm 細胞培養用ディッシュを用いて培養表面積の約90%を占めるように播種し、そのまま経時的に5%FBS含有Ham's F-12培地交換を続けた。培養表面積の約100%を超えてもそのまま5%FBS含有Ham's F-12培地交換を続けた結果、過剰増殖となり、接触阻害による分裂阻害は見られないと判断した(data not shown)。

CHO-KTG5細胞株を、5%FBS含有Ham's F-12培地および100 mm x 20 mm 細胞培養用ディッシュを用いて培養表面積の40~50%を占めるように播種し、定着後、陰性対照群として5%FBS含有Ham's F-12培地のみの処理群、ALLN (Sigma-Aldrich 208719)を10 μMまたは20 μM含有する5%FBS含有Ham's F-12培地処理群、または、Roscovitine (Sigma-Aldrich 557360)を15 μMまたは30 μM含有する5%FBS含有Ham's F-12培地処理群を設定し、各培地で終夜培養(約16時間)した後、TC10全自動セルカウンターを用いて細胞濃度を計測した。その結果、陰性対照群と比較し、ALLNおよびRoscovitine処理群の細胞濃度が半分程度であった(data not shown)。引き続き、これらの条件下における細胞周期解析を、Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. C10632)、Cell Cycle Assay Solution Deep Red(富士フイルム和光純薬348-09591)およびBD FACScan toIIフローサイトメーターを用いて実施した。特に、新生DNA合成はClick-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay Kit、既存のDNAはCell Cycle Assay Solution Deep Redにより分けて染色した。

C. 研究結果

CHO-KTG5細胞株を用いるCHO/TAM解析系において、細胞濃度計測により接触阻害や無血清下での細胞分裂活性を確認した

別添 3

結果、どちらの条件でもまったく細胞分裂活性の抑制が見られなかった。他方、CDK阻害剤等の処理下では細胞分裂活性が抑制される処理条件を明らかにした。これらの条件下での細胞周期を解析した結果、陰性対照群と比較し、ALLNの10 µM処理群ではほとんどの細胞でのS期の抑制が見られ、さらに20 µM処理群ではほぼすべての細胞でのS期の抑制が見られた(図3)。Roscovitine 15 µM処理群ではかなりのS期の抑制が見られるものの、完全な抑制ではなかった。Roscovitine 30 µM処理群では、ALLN 20 µM処理群と同様に、ほぼすべての細胞でのS期の抑制が見られた(図3)。

D. 考察

CHO細胞は増殖効率が非常に高いことが知られており、接触阻害や無血清下での増殖抑制が見られない可能性は概ね予想していたが、続くTAM解析では目的外の化学物質による影響を可能な限り排除する必要があるため、初案として化学物質を使用しない方法での細胞分裂活性の抑制を目指した。その結果、やはりCHO-KTG5細胞株を用いるCHO/TAM解析系において、接触阻害や無血清下においては細胞分裂活性の抑制が見られなかった。

引き続き、細胞周期の進行を抑制することが知られているALLNまたはRoscovitine処理を行った結果、今回採用した実験条件でS期を十分に抑制できることを明らかにした。他方、新生DNA合成と既存のDNAを区別するため、それぞれをClick-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay KitまたはCell Cycle Assay Solution Deep Redにより分けて染色したが、Cell Cycle Assay Solution Deep RedはEdU等を用いる新生DNA染色との同時使用により凝集体が見られることやフローサイトメーター解析時のサイトグラムが若干乱れることなどから、上記の二重染色の相性が最適では無いと考える。したがって、より詳細なS期抑制を解析するため、BrdUや7-AADを用いる二重染

色を用いるなどの工夫が必要である。

今回の結果により、ALLNまたはRoscovitine処理によりS期の抑制条件が確認できたため、今後はこれらの条件下において、アルキル化剤などによるTAM解析を実施する。

E. 結論

一般的に突然変異誘発にはDNA複製が主に関連することが知られており、DNA複製が活発に行われている場合、TAMの詳細を解析することが困難となる。そこで、初年度である今年度は、CHO/TAM解析系においてDNA複製の影響を抑制する実験条件を明らかにするため、CHO/TAM解析系での細胞分裂活性抑制条件を検討した。その結果、CHO-KTG5細胞株を用いるCHO/TAM解析系において、ALLNまたはRoscovitine処理によりS期が十分に抑制できることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Parsons BL, Beal MA, Dearfield KL, Douglas GR, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Kenyon M, Long AS, Lovell D, Lynch AM, Myers MB, Pfulher S, Vespa A, Zeller A, Johnson G, White PA. Severity of Effect Considerations Regarding the Use of Mutation as a Toxicological Endpoint for Risk Assessment: A Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Environmental and Molecular Mutagenesis*. in press

G.2 学会発表

1. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一: Detection of genotoxic reactions by analyzing DNA damage response using

別添 3

- chromatin immunoprecipitation. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7)
2. 磯貴子, 村田康允, 広瀬望, 馬野高昭, 津田雅貴, 堀端克良, 杉山圭一, 増村健一, 松本真理子: In vivo mutagenicity evaluation of cobalt acetate tetrahydrate. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7)
 3. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一: クロマチン免疫沈降法を利用したアルキル化剤誘発遺伝毒性反応の検出. 第 83 回日本癌学会学術総会 (2024.9)
 4. 堀端克良, 安東朋子, 吉田愛海, 杉山圭一: 遺伝情報発現に付随する突然変異誘発. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 (2024.12)
 5. 松本真理子, 磯貴子, 馬野高昭, 村田康允, 広瀬望, 増村健一, 堀端克良, 杉山圭一: トルエンジイソシアネート経口投与による MutaMouse 肝臓における変異原性. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 (2024.12)
 6. 羽倉昌志, 加藤雅之, 川上久美子, 皿田巳子, 須井哉, 杉山圭一, 堀端克良, 峯川和之, 山本美佳, 山田雅巳: TA100 株の全ゲノム解析: 遺伝子変異のロット間比較 (BMS pilot study). 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 (2024.12)
 7. 増村健一, 安東朋子, 堀端克良, 石井雄二, 杉山圭一: アクリルアミドが誘発する生殖系列突然変異の解析. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 (2024.12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

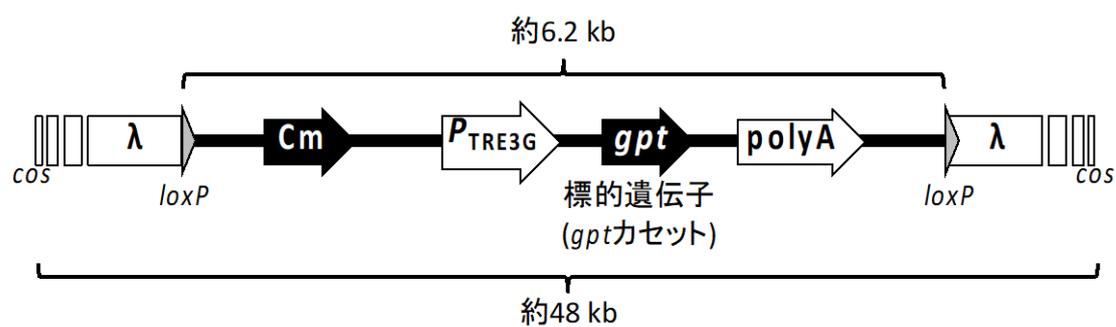


図1. CHO/TAM解析系で用いるファージDNAコンストラクトの略図

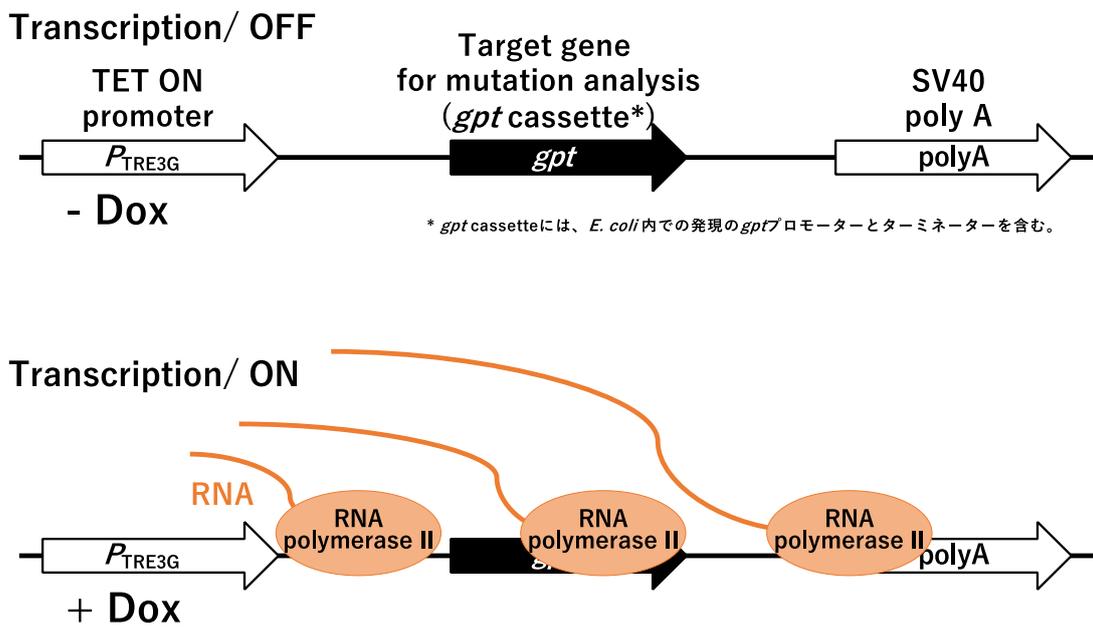


図2. ドキシサイクリン添加によるTAM解析系での転写の制御

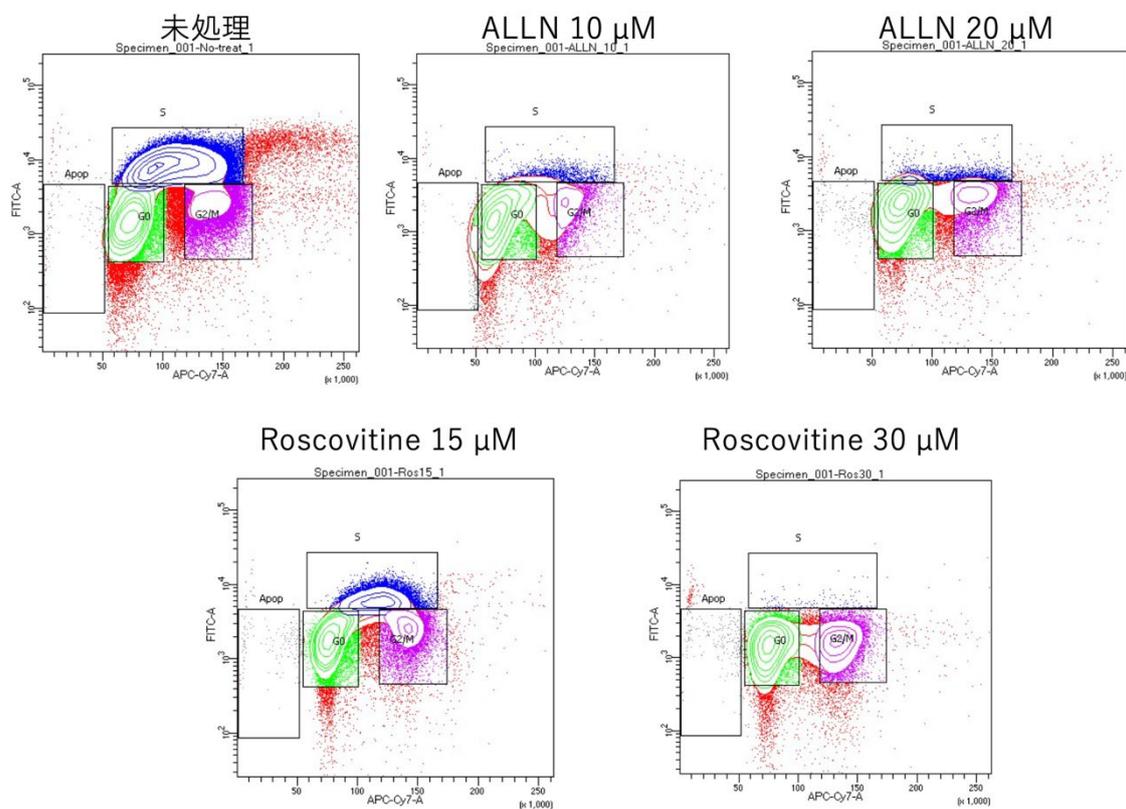


図3. TAM解析系におけるS期抑制の条件検討

令和6年度 厚生労働科学研究費補助金 補助金（化学物質リスク研究事業）

化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および *in vitro*

リスク評価法開発のための研究

分担報告書名: 化学物質によるゲノム毒性検出法の開発

研究分担者 伊澤和輝 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部

研究分担者 杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部

研究要旨

近年、化学物質等が細胞分裂終了後の体細胞に体細胞突然変異やメチル化等のエピジェネティクス異常を引き起こすことが報告されており、ヒト健康影響が懸念されている。そのため、体細胞突然変異やエピジェネティクス異常等のゲノム毒性の検出法を確立し、細胞分裂終了後の細胞を用いた *in vitro* ゲノム毒性リスク評価系を開発することは化学物質安全管理推進のために重要である。

ゲノム毒性のうち、体細胞突然変異に関しては *in vitro*、*in vivo* の試験がこれまでに開発されているが、近年においては従来手法よりも精緻な変異原性評価が可能な手法として、次世代シーケンサー（NGS）のエラーを低減し低頻度の体細胞変異を検出可能とする *error-corrected sequencing*（*ecNGS*）が開発され、世界的に注目されている。*ecNGS* を用いた手法においては、原理的にゲノム全体の変異を検出することが可能であり、レポーター遺伝子など特定の遺伝子に限定されない変異原性評価法であるため応用の幅も広い。

本分担研究においては、分裂終了後の細胞に対して *ecNGS* を適用することで、化学物質による影響を評価する手法の確立を目指す。前提条件として、ある生体組織において細胞分裂を終了した細胞は、細胞分裂を終了していない細胞に比べ、時間経過とともに細胞集団内でその割合を小さくしていくと考えられる。これまで *ecNGS* は細胞や DNA 量が潤沢な条件（10 万細胞程度、500ng 程度）で利用されてきたため、本研究で着目するような、少数細胞あるいは採取可能な DNA 量が少ない条件での実施例が少ない。そのため、本年度においては、まず *ecNGS* 解析に必要な量の DNA 断片分子を確保する手法について検討した。

本年度においては、まず先行研究で用いられている PCR 法を検討した。その結果、従来法の 10 分の 1 程度の DNA 量（50ng 程度、1 万細胞程度）から十分量の DNA 断片分子を確保することができた。また従来法の 100 分の 1 程度の DNA 量でも十分量の DNA 断片が回収可能であることが示唆された。加えて PCR 法の検討と平行して、既存手法のプロトコルを改良し、細胞・DNA 量の少ない条件に適用する手法を検討した。一部プロトコルの改良の結果、従来法の 10 分の 1 程度の DNA 量（100ng 程度、2 万細胞程度）の DNA 量で十分量の分子を回収し、*ecNGS* による解析が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、化学物質等が細胞分裂終了後の体細胞に体細胞突然変異やメチル化等のエピジェネティクス異常を引き起こすことが報告されており、ヒト健康影響が懸念されている。そのため、体細胞突然変異やエピジェネティクス異常等のゲノム毒性の検出法を確立し、細胞分裂終了後の細胞を用いた *in vitro* ゲノム毒性リスク評価系を開発することは化学物質安全管理推進のために重要である。

ゲノム毒性のうち、体細胞突然変異に関しては *in vitro*、*in vivo* の試験がこれまでに開発されているが、近年においては従来手法よりも精緻な変異原性評価が可能な手法として、次世代シーケンサー (NGS) のエラーを低減し低頻度の体細胞変異を検出可能とする *error-corrected sequencing* (ecNGS) 法が開発され、世界的に注目されている。ecNGSを用いた手法においては、原理的にゲノム全体の変異を検出することが可能であり、レポーター遺伝子など特定の遺伝子に限定されない変異原性評価法であるため応用の幅も広い。

本分担研究においては、分裂終了後の細胞に対してecNGSを適用することで、化学物質による影響を評価する手法の確立を目指す。前提条件として、ある生体組織において細胞分裂を終了した細胞は、細胞分裂を終了していない細胞に比べ、時間経過とともに細胞集団内でその割合を小さくしていくと考えられる。これまでecNGSは細胞やDNA量が潤沢な条件 (10万細胞程度、500ng程度) で利用されてきたため、本研究で着目するような、少数細胞あるいは採取可能なDNA量が少ない条件での実施例が少ない。そのため、本年度においては、まずecNGS解析に必要な量のDNA断片分子を確保する手法について検討した。

B. 研究方法

B-1. PCR 法による DNA 断片分子確保

ラット由来のゲノム DNA 50ng から、

ThruPLEX® Tag-Seq HV kit (タカラバイオ株式会社, 日本) を用い、キット付属のプロトコルに従って NGS 解析可能な DNA 断片分子 (ライブラリ) を作製した。シーケンスには NovaSeq (Illumina, Inc., USA) を用い、シーケンスデータの解析についてはキット付属のプロトコルに従った。

B-2. 従来手法のプロトコル改良による DNA 断片分子確保

従来の ecNGS 手法である PECC-Seq 法 (You et al., 2020) においては、ビーズ精製によるフラグメントスクリーニングのステップが存在し、これによって 150bp 程度の DNA 断片を取得していたが、このステップにおいて多くの DNA を損失していると考えられた。

一方で、事前のプロトコル改良の検討により、酵素反応による DNA 断片化ステップにおいては、DNA 断片が 150bp 程度に断片化されているため (図 1)、ビーズ精製によるフラグメントスクリーニングのステップを行わないことで少量 DNA に対応可能であると考えられた。

そこで PECC-Seq 法におけるライブラリ作製プロトコルを改良し、モデル非分裂性細胞である HepaSH 細胞由来のゲノム DNA 100ng を NEBNext® dsDNA Fragmentase® (New England Biolabs, USA) により、37°C、30 分の条件で断片化を行った。断片化した DNA を Invitrogen™ S1 Nuclease (Thermo Fisher Scientific, USA) で 30°C、30 分処理した。得られた約 150bp 程度の DNA 断片について TruSeq DNA PCR-Free Kit (Illumina, Inc., USA) を用いて illumina 社シーケンサー用のライブラリを作製した。シーケンスには NovaSeq (Illumina, Inc., USA) を用いた。この時、フラグメントスクリーニングのステップをスキップした。得られたリードデータについて、アダプター配列を Trimmomatic (v0.39) を用いて除去した。その後、公開されているヒトのゲノム配列 (GRCh38.p14) に対し、Burrows-Wheeler

aligner (BWA) の `bwa mem` モードによってリードのマッピングを行った。

C. 結果及び考察

C-1. PCR 法による DNA 断片分子確保

PCR 法による DNA 断片分子 (ライブラリ) 必要量確保のため ThruPLEX® Tag-Seq HV kit を用いた。DNA 50ng から本キットを用いて 2 回の処理を行った結果平均して約 443nM の濃度のライブラリが得られた。標準的なライブラリの濃度としては 5nM 程度の濃度が目標となるため、十分量のライブラリが得られたと言える。また標準プロトコルにより目標濃度の約 90 倍の濃度のライブラリが作製されたことから、50ng よりも少ない DNA 量からでも十分量のライブラリが作製できると考えられる。加えて、ecNGS 解析の際には PCR によるエラーがバックグラウンドの変異頻度として検出されてしまうと考えられるが、標準プロトコルにおける PCR サイクルをより少ない回数に設定することが可能であり、これにより PCR エラーを低減することができると考えられる。

実際に R7 年度研究計画を先行し、1 サンプルについて解析を行ったところ、本年度において作製したライブラリにおいてはバックグラウンドの変異頻度においても 1.0×10^{-6} 以上の変異頻度があると考えられ、プロトコルの改良が必須であることが示唆された。

C-2. 従来手法のプロトコル改良による DNA 断片分子確保

実際にフラグメントスクリーニングのステップを行わずに作製したライブラリは約 4.6nM で目標濃度に近い濃度が得られた。

得られたライブラリについてシーケンシング・マッピング解析を行った結果から DNA 断片長を計算したところ、100bp 以下、および 250bp 以上の部分まで幅広くリードが存在している一方で 150bp 付近にピークが存在し (図 2)、量・質共に既存手法での解析

に十分なライブラリが得られたと考えられる。

D. 結論

本分担課題と並行して「神経細胞、ミクログリアの採材法開発と細胞老化度標の明確化」の課題が進行しており、班会議報告においては次年度以降 ecNGS を適用すべき細胞は、一匹のマウスから $3.0\sim 4.0 \times 10^4$ 細胞程度得られると報告されており、ここから取得可能な DNA 量は最大 200~500ng 程度と考えられる。本年度行った従来手法のプロトコル改良による DNA 断片分子確保においては 100ng 程度の DNA 量から ecNGS が可能であることが示唆されているため、次年度以降に目的の細胞を用いて ecNGS が可能であると考えられる。

加えて、本年度に得られた知見は、今後の ecNGS による低頻度体細胞変異の解析の適応範囲を拡大する上で重要であると考えられる。ecNGS は既存の動物試験を代替する手法として国際的なガイドライン化を目指した議論が急速に進行している。ecNGS に関する議論においては、技術の精度、特にバックグラウンドとしての変異頻度について着目されることが多いが、必要な細胞数や DNA 量など、本技術が適応可能な範囲については知見が少なかった。

本年度においては、ecNGS を可能とするライブラリを作製するための初期 DNA 量についての知見が得られた。特に既存手法のプロトコルの改良と利用については、依然として改良の余地があり、より少ない細胞数・DNA 量から ecNGS に適したライブラリ分子が作製可能であると考えられる。

現状において、ecNGS は遺伝毒性試験である遺伝子改変げっ歯類 (TGR) 試験に代わり、TGR を用いない *in vivo* 毒性試験である発がん性試験や一般毒性試験の試験試料に対し、ecNGS 手法を用いることによって変異原性評価までを行うような試験のマルチエンドポイント化および代替が期待されている技術である。一方で、本課題で取り組ん

別添 4

でいる、少数細胞・少量 DNA についての知見が集積することで、例として動物血中に存在する DNA 等を用いた遺伝毒性評価が可能となり、さらなる動物試験の 3Rs に貢献できる可能性がある。

E. 研究発表

E-1. 論文発表

1. Shimizu N, Izawa K, Washif M, Morozumi R, Hirota K, Tsuda T: Role of TDP2 in the repair of DNA damage induced by the radiomimetic drug Bleomycin. *Genes Environ.* 28;47(1):7. 2025

E-2. 学会発表

1. 伊澤和輝. ecNGS ってなんだ？ 日本環境変異原ゲノム学会 第 84 回 MMS 研究会, 2024 年 6 月 (東京)
2. 伊澤和輝、津田 雅貴、鈴木 孝昌、本間 正充、杉山 圭一. ラット試料を用いた ecNGS による in vivo 変異原性評価法の確立に向けた研究. 第 47 回 日本分子生物学会 2024 年 11 月 27 日 (福岡)
3. 伊澤和輝、津田雅貴、鈴木孝昌、本間正充、杉山圭一、NGS を用いたラット試験試料からの in vivo 変異原性データ取得への取り組み、第 52 回構造活性相関シンポジウム、2024 年 12 月 (神奈川)
4. 伊澤和輝、データ解析におけるドメイン知識の重要性：ecNGS 解析編、日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 Potential for Computational Genotoxicity シンポジウム、2024 年 12 月 (岡山)

F. 知的所有権の取得状況

F-1. 特許取得

該当なし

F-2. 実用新案登録

該当なし

F-3. その他

該当なし

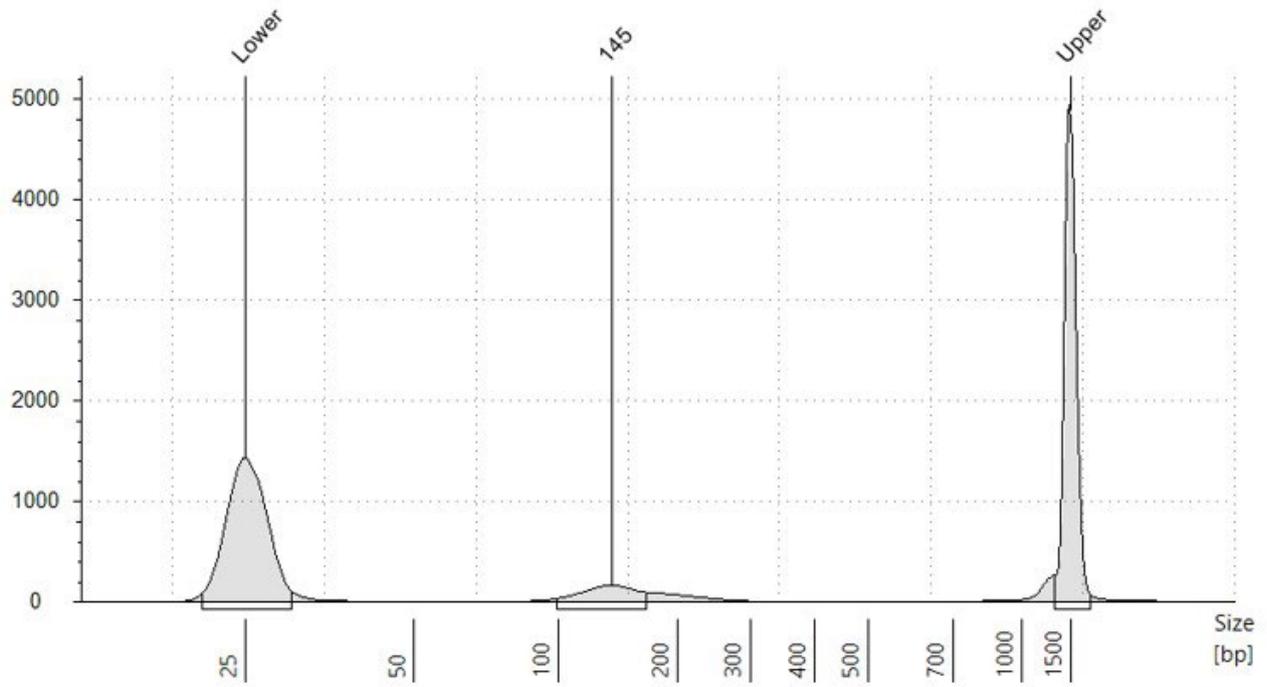


図 1. 酵素反応による DNA 断片化における DNA 断片長の分布例

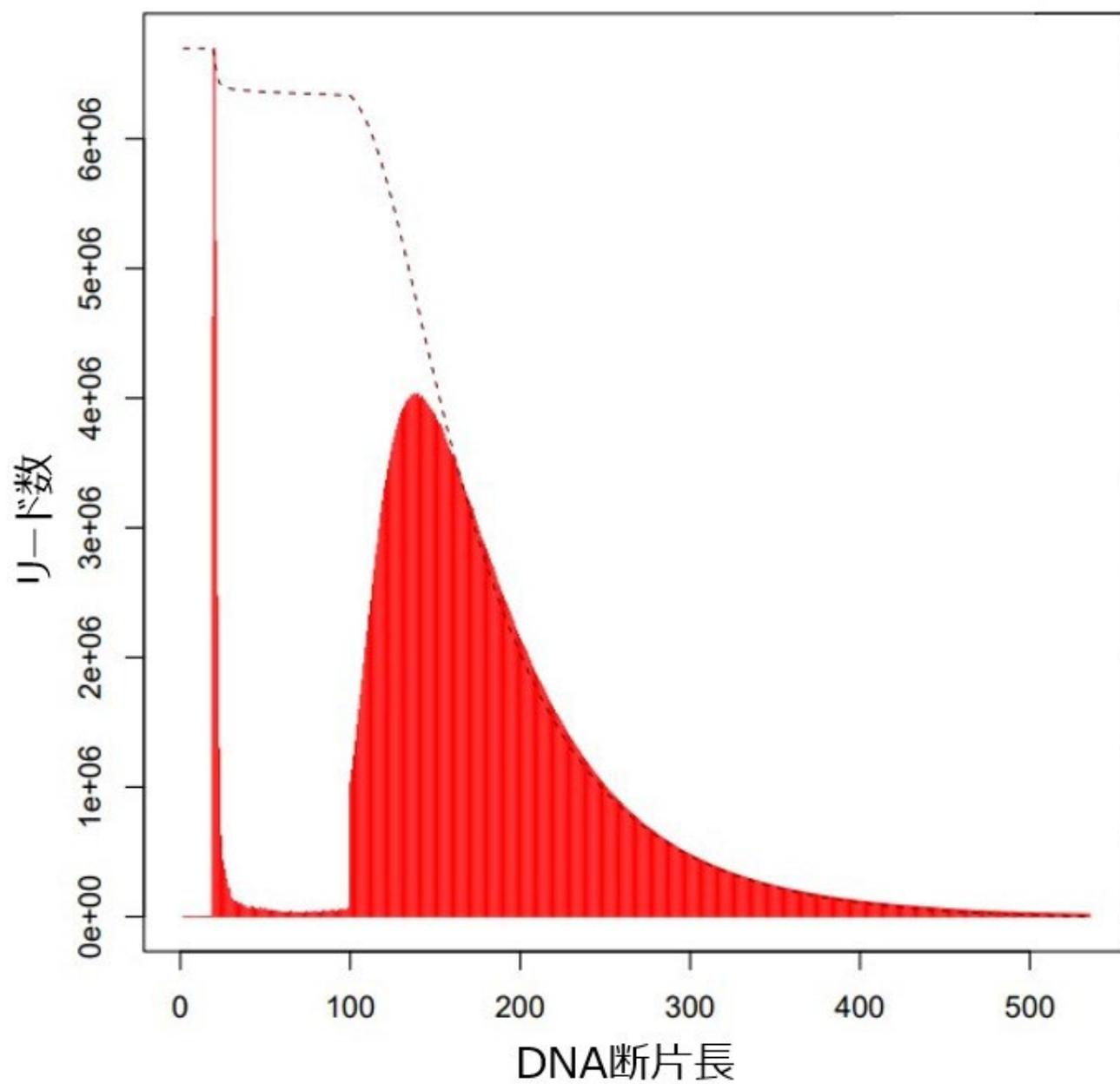


図 2. フラグメントスクリーニングをスキップしライブラリ作製した際の DNA 断片長分布

令和6年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および in vitro リスク評価法開発のための研究
分担研究報告書

分担研究課題名：DNAメチル化異常を介した化学物質によるゲノム毒性の検出

研究分担者 鈴木孝昌、杉山圭一

研究要旨

DNAメチル化等のエピジェネティックな変化は、細胞老化やがんをはじめとする様々な疾患の原因として注目されている。化学物質の遺伝毒性評価に関しては、これまで突然変異や染色体異常といったDNAの直接的な損傷を対象としてきたが、ゲノム全体への影響としてのゲノム毒性という観点からは、DNAメチル化等のいわゆるエピジェネティックな変化も、ゲノムの不安定性誘発の原因として無視できない。簡便な試験法がなかったこともあり、これまでこうしたエピジェネティックな作用はあまり注目されてこなかったが、化学物質等のゲノム影響を評価するにあたり重要である。我々は、これまでにナノポアシークエンサーを用いて直接メチル化塩基を検出することによる簡便迅速な解析手法の開発を行ってきており、今後は、比較的簡便な手法でDNAのメチル化状態を調べることにより、DNAメチル化異常を介したゲノム不安定性誘発作用を検討できる予定である。

こうした解析に向け、本年度はまず神経細胞、ミクログリアにおいてメチル化等エピジェネティクス異常を呈するターゲット遺伝子群等を文献調査した。その結果、グルココルチコイド受容体遺伝子(NR3C1)、オキシトシン受容体(OXTR)、TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)など、多くの疾患において特定遺伝子のメチル化の異常が関わっていることがわかった。この結果は、一般的には増殖しない細胞においてもエピジェネティックな変化は誘発しうることを示唆している。また、DNAメチル化異常を引き起こす側の化学物質、いわゆる“epi-mutagen”の存在についても調査を行った。

さらに本研究班においては、error-corrected NGS (ecNGS)法を用いた遺伝毒性の検出が行われているが、神経細胞等の非分裂細胞においてはその感度が低いことも予想されるため、最近報告された片側鎖の変異、すなわち mismatch 変異も検出できるという ecNGS 法である HiDEF-Seq 法についても、その応用の可能性を調査した。

A. 研究目的

近年、DNAメチル化等のエピジェネティックな変化は、細胞老化やがんをはじめとする様々な疾患の原因として注目されている。DNAメチル化異常は、細胞内のエピジェネティックな制御機構の破綻を示す指標となり得る。こうした背景から、DNAメチル化異常の検出手法開発は、ゲノムの不安定

性のスクリーニングと化学物質の安全性評価の両面で極めて重要な意義を持つ。

DNAメチル化の解析にはこれまで様々な手法が用いられてきたが、何れも操作が複雑で会ったり、高額な機器を必要としたりして、一般に普及していなかった。しかし、最近になって第三世代の一分子シークエンサーとされるナノポア型のシークエ

ンサーを用いることにより、煩雑な前処理なく直接 DNA メチルを検出できることが報告された。我々は別途、このナノポアシークエンサーを用いて、簡便迅速に DNA メチル化の検出を行う手法の開発を検討してきたが、その確率に目途が立ち、本研究においても、DNA メチル化解析を比較的簡便に行える見通しがたった。

これまで遺伝毒性の分野においては、主に突然変異や染色体異常を指標に安全性の評価を行ってきたが、DNA メチル即ちエピジェネティックな異常を誘発するという観点からは、被験物質の安全性の評価は行われていなかった。しかし、化学物質の安全性評価において、遺伝子突然変異のみならず、エピジェネティックな変化を指標として組み込むことで、より包括的なリスク評価が可能となる。特に本研究班の標的となる神経細胞等の増殖を伴わない細胞群においては、従来の遺伝毒性学的指標による評価が難しいことも予想され、エピジェネティックな変化も含めた広い意味でのゲノム安定性を評価する必要がある。そこでまず、神経疾患等において、その原因として DNA メチル化異常が関わっている疾患とその原因遺伝子に関して、文献調査を行った。また、その原因物質として、エピジェネティックな異常を誘発する物質、いわゆる”epi-mutagen”の存在に関しても、これまでわかっていることを調査した。

B. 研究方法

以下の項目に関して PubMed 等を用いた文献検索を行い、リストした論文がヒットしたため、これらの内容に関して検討を行った。

1. 神経系疾患におけるメチル化異常と原因遺伝子

- Lossi L, et al., An Overview of the Epigenetic Modifications in the Brain under Normal and Pathological Conditions. *Int J Mol Sci.* 2024, 30, 25, 3881.
- Iwamoto K. et al., Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons. *Genome Res.* 2011, 21, 688-96.
- Wilker S, et al., Epigenetics of traumatic stress: The association of NR3C1 methylation and posttraumatic stress disorder symptom changes in response to narrative exposure therapy. *Transl Psychiatry.* 2023, 13, 14.
- Fujisawa TK, et al., Oxytocin receptor DNA methylation and alterations of brain volumes in maltreated children *Neuropsychopharmacology* 2019, 44, 2045-2053.
- Koike Y., et al., Age-related demethylation of the TDP-43 autoregulatory region in the human motor cortex. *Commun Biol,* 2021, 21, 1107.
- Fujisawa TK, et al., Alterations in Chromatin Structure and Function in the Microglia. *Front Cell Dev Biol,* 2021, 8, 626541

- Mathilde Cheray M, et al., Epigenetics Control Microglia Plasticity. Front Cell Neurosci, 2018, 12, 243.

2. DNA メチル化異常を起こす化合物

- Arai Y, et al., Epigenetic assessment of environmental chemicals detected in maternal peripheral and cord blood samples, J Reprod Develop. 2011, 57, 507-551.
- Blanc M, et al., Environmental chemicals differentially affect epigenetic-related mechanisms in the zebrafish liver (ZF-L) cell line and in zebrafish embryos. Aquatic Toxicology, 2019, 215, 105272.
- Sharma N, et al., Mitochondrial DNA: Epigenetics and environment. Environ Mol Mutagen, 2019, 60, 668-682.
- Tabish AM, et al., Epigenetic factors in cancer risk: effect of chemical carcinogens on global DNA methylation pattern in human TK6 cells. PLoS One, 2012, 7, e34674.

3. HiDEF-Seq 法

- Liu MH, et al., DNA mismatch and damage patterns revealed by single-molecule sequencing. Nature, 2024, 630, 752-761.

C. 結果

1. 神経系疾患におけるメチル化異常と原因遺伝子

脳神経系組織は一般に分裂せず、再生が難しいため、傷害が直接組織障害や病態へと結びつく危険性がある。エピジェネティックな変化もゲノム不安定性等の異常として細胞に障害を与え、様々な疾患の原因となることが考えられる。これまでに得られている情報から、神経系疾患におけるメチル化異常と原因遺伝子について検索した。エピジェネティックな変化としては、DNA メチル化に加えて、ヒストン修飾、miRNA の発現などの要因が考えられるが、後述するように簡便なスクリーニング系の応用という観点から、DNA のメチル化に焦点を絞って検討を行った。

論文検索から、メチル化の異常とその関連遺伝子が明らかになっている神経系疾患として以下のような事例が見つかった。

- うつ病や心的外傷後ストレス障害 (PTSD) 等のトラウマとグルココルチコイド受容体遺伝子 (NR3C1) メチル化
- 虐待などのマルトリートメント (不適切な養育) とオキシトシン受容体 (OXTR) のメチル化
- 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) のメチル化

NR3C1 遺伝子に関しては最も研究が進んでおり、大うつ病 においては、NR3C1 のプロモーター領域のメチル化増加が、この遺伝子の転写サイレンシングと関連しています。また、PTSD 患者で、NR3C1 CpG サイトのメチル化が報告されている。NR3C1 遺伝子は、グルココルチコイド受容体をコードする遺伝子としてストレス応答システムの重要

な構成要素となっており、この遺伝子のメチル化の異常が精神的なストレスに対する応答の障害となって現れることが知られている。

OXTR 遺伝子については、虐待などのマルトリートメントを受けた子供で通常の同年代の子供に比べてメチル化が増加していることが報告されている。メチル化率の大きさは、他者との愛着形成に重要とされる「左前頭眼窩皮質の容積」と関連しており、その容積の小ささは子供が他者に示す「愛着不安の高さ」とも関連していることが明らかとなった。

TDP-43 は、正常では核内で生体に重要な様々な機能を担うタンパク質であるが ALS 患者の運動神経細胞では TDP-43 が核から消失し、細胞質に凝集する。TDO-43 はその mRNA のスプライシングをコントロールすることにより自らの存在量を調節しているが、そこには DNA メチル化が関わっており、ALS 患者では、運動機能を司る運動野において TDP-43 の自己調節領域の脱メチル化が進行し TDP-43 量が増加することが報告された。ミクログリアにおける DNA メチレーションに関する検討は少ない。アルツハイマー病 (AD) の脳において、グローバルメチレーションレベルの増加 (hypermethylation) が報告されているが、ミクログリアにおいては変化しない。DNA メチル化に関しては、外傷性脳損傷 (TBI) のラットモデルにおいて、ミクログリアにおけるグローバルなメチル化の変化が観察されている。このモデルでは、免疫組織化学と二重染色法を用いて、反応性ミクログリアのサブ集団が同定され、この集団が低メチル化細胞の主要な供給源であることが明らかにされた。

特定の遺伝子のメチル化に注目すると、老化したミクログリアでは IL1 β 遺伝子の発現が DNA メチル化によって制御されていることが示されている。IL1 β 遺伝子の低メチル化は、老化モデルにおいてサイトカイン産生のアップレギュレーションと関連している。

また、パルミチン酸がミクログリア細胞において PGC-1 α プロモーターのメチル化を誘導し、この遺伝子の発現を低下させ、ミトコンドリア含量を減少させることを観察された。また、DNMT3L は、LPS 処理等によってミクログリアが活性化された後に発現が上昇することが判明している。

AD とミクログリアの関連については、アミロイド沈着マウスモデルにインターロイキン (IL) -33 を注射すると、ミクログリアのエピジェネティックおよびトランスクリプトーム・プロファイルが再プログラムされ、食食活性が増強されたミクログリア亜集団が誘導されることによって、A β 病態が改善されることが報告されている。

このように、特定遺伝子のメチル化状態が、その遺伝子の関連する脳神経系疾患に結び着くことが知られており、病因としてのエピジェネティック異常の重要性が浮き彫りとなってきている。またエピジェネティックな変化は、脳の発達過程においてより重要な役割を担っていることが知られているとともに、老化においても特定遺伝子のメチル化レベルがその指標となる (Epigenetic Clock) ことがわかってきている。エピジェネティック異常は、酸化ストレスや炎症、ミトコンドリア機能の喪失などを介して各種疾患や老化へ結び着くと考えられ、化学物質によりもたらされるエピジェ

ネティックな異常の評価は、今後重要な課題となる。

2. DNA メチル化異常を起こす化合物

DNA のメチル化異常が、老化や様々な疾患に結び付くことがわかってきているが、Hazard としてこうした異常を引き起こす化合物、いわゆる“epi-mutagen”は存在するであろうか？突然変異を引き起こす“mutagen”に関しては既に多くの研究がなされ、多くの mutagen とそのメカニズムが明らかになっている、一方で、エピジェネティック異常を引き起こす epi-mutagen については、これまであまり調べられてこなかった。そこでこの epi-mutagen に関して文献調査を行った。

Arai らはヒト胎児環境から見つかっている 25 種類の化学物質について、その epigenetic mutagenic な作用を検討するため、マウス ES 細胞 (ESC) におけるヘテロクロマチンの形態学的変化と DNA メチル化状態に対する影響を臍帯血の血清濃度で調べた。その結果、diethylphosphate, cotinine, octachlorodipropyl ether, mercury, selenium の 5 化合物がヘテロクロマチンの状態に変化を与え、Hg と Se は DNA メチル化異常を引き起こした。これら 5 化合物に対して iPS 細胞からニューロスフェアへの誘導に与える影響試験した結果、各化合物共に血清中濃度では影響を与えなかったが、混合処理した場合には、ニューロスフェアのサイズと遺伝子発現及び神経系への分化に影響を与えた。

Tabish らは、遺伝毒性試験で良く用いられるヒト TK6 細胞を用いて、5 つの直接変異原及び 10 の代謝活性化を必要とする変異原

物質について DNA メチル化に与える影響を調べている。グローバルメチレーションの検出には LC-MS/MS を用い、代謝活性化にはヒト肝 S9 を使っている。調べた化合物のうち、benzene, hydroquinone, styrene, carbon tetrachloride, trichloroethylene がグローバルメチレーションの低下を誘発した。遺伝毒性を持つ化合物が同時にエピジェネティックな作用を示すという結果は注目され、今後エピジェネティックな作用から mutagen を再検討する必要性が示唆された。

さらに、ゼブラフィッシュでの検討ではあるが Blanc らは環境化学物質 (ビスフェノール類、パーフルオロ化学物質 (PFAS)、メトキシクロル、ペルメトリン、ビンクロゾリン、クマリン 47) のエピジェネティック関連メカニズムに及ぼす影響を、ゼブラフィッシュ胚および肝細胞 (ZFL) を用いて測定した。その結果、ゼブラフィッシュ胚では、ビスフェノール A、クマリン 47、メトキシクロル、ペルメトリンへの暴露により、エピジェネティック因子の転写が著しく変化した。ZFL 細胞では、クマリン 47 を除くすべての化学物質への暴露で有意な転写変化が観察されたが、パーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) だけがグローバルな DNA メチル化に有意な影響を与えた。

3. HiDEF-Seq 法に関する検討

最近 Liu らにより、PacBio 社のロングリードシーケンサーを用いた新規 ecNGS 法である Hairpin Duplex Enhanced Fidelity sequencing (HiDEF-Seq) 法が開発された。PacBio 社のシーケンサーを用いた ecNGS 法は、Circular Consensus Sequencing によ

る高精度な読み取り (HIFI リード) を原理として以前から用いられているが、HiDEF-Seq 法では、ライブラリーをより短くすることによりシーケンスの冗長度を上げることにより精度を高め、二本鎖のみならず一本鎖における変異、すなわちミスマッチ変異をも検出可能だとされている。本研究班で用いる神経系の細胞では、分裂頻度が高いため二本鎖間の変異として固定される確率が低く、通常の ecNGS 法では検出が難しいことが懸念されるが、HiDEF-Seq 法を用いることにより、一本鎖状態での変異も検出することによりその問題を解決できると期待できるため、この手法の適応の可能性を検討した。

オリジナル論文では、PacBio 社のシーケンサーとして一世代前の sequel II が使われており、Raw data にあたる Subreads BAM ファイルをインプットとして解析が行われている。解析のワークフローは GitHub 上に公開されているが、解析環境の要求度が高く、クラスター PC システムの構築が必要なため、障壁が高い。一方、PacBio 社の新規シーケンサーとして Revio がリリースされたが、この機種においては Subreads BAM を出力できず、HIFI リードデータのみが利用可能となっている。これにより、将来的には Revio の HIFI リードデータをインプットとして、HiDEF-Seq 法と同じ解析環境を構築する必要があることがわかった。その解析のために必要な付加情報に関しては、Revio シーケンサーの設定により取得可

異常が関与していることが報告されており、化学物質のハザードとしての epi-mutagen 的な作用の評価は重要な課題となっている。

能なことがメーカーへの調査により判明したため、来年度はその実現に向けた検討を開始することとした。

4. ナノポア型シーケンサーを用いた簡便迅速な DNA メチル化解析系の利用

本研究にて必要となる簡便迅速な DNA メチルの検出法の開発を行った。DNA のグローバルメチレーション (5mC, 5hmC) を比較的簡便に測定できる系を開発できており、来年度はその手法を用いて本研究課題におけるサンプルのメチル化レベルの検討に応用が可能となっている。また、現在はグローバルメチル化レベルの解析のみであるが、来年度には個別遺伝子のメチル化レベルの解析も可能となる予定であり、本研究班へもその技術を導入できることを想定して検討を進める。

D. 考察

神経細胞、ミクログリアにおける DNA メチル化等のエピジェネティックな異常と疾患及び関連遺伝子に関する調査を行ったが、特定遺伝子のメチル化異常が脳神経系疾患の原因となっていることがわかった。これか疾患に関連する遺伝子は、今後部位特異的メチル化の解析における対象遺伝子として利用する予定である。また、物質側としても、エピジェネティクスを攪乱するいわゆる epi-mutagen の存在が報告されているが、まだ研究の歴史が浅いため mutagen のように確立した地位が築かれていない。近年、老化や様々な疾患にエピジェネティックな

解析手法の煩雑さがその研究の振興を遅らせていたが、完全迅速な DNA メチル化スクリーニング法を適応することにより、その

評価に迫りたい。特に現在問題となっている PFAS 関連化合物に関しては、*epi-mutagen* 的な作用が指摘されており、我々の系においても最終年度までには再評価を行いたい。

神経系細胞等の増殖能の低い細胞でのゲノム毒性の評価はこれまであまり行われて来なかったが、エピジェネティックな作用を含めてゲノム不安定性という観点からの安全性評価が重要となっている。我々が開発した *ecNGS* 法である *PECC-Seq* もその評価に役立つことが期待されるが、ミスマッチ変異を含んだ非増殖細胞における遺伝毒性を確実に評価するために、新規 *ecNGS* 法である *HiDEF-Seq* 法の活用についても検討をした。現状の課題を把握するとともに、実用に向けた可能性に目途が立ったため、来年度はその応用に向けた具体的な検討を開始する予定である。

E. 結論

特定遺伝子のメチル化異常が、神経疾患の発生に直接かかわっていることが明らかとなっている。ミクログリアにおいても、その機能がエピジェネティックに制御されている可能性があり、*epi-mutagen* によりその調節機能が障害される危険性がある。DNA メチル化異常の誘発という観点から化学物質の安全性を評価し、*epi-mutagen* に関する理解を深めることが重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Furihata C., Suzuki T. Four

functional genotoxic marker genes (*Bax*, *Btg2*, *Ccng1*, and *Cdkn1a*) discriminate genotoxic hepatocarcinogens from non-genotoxic hepatocarcinogens and non-genotoxic non-hepatocarcinogens in rat public toxicogenomics data, *Open TG-GATEs*. *Genes Environ.* 2024; 46: 28.

2. Hosoi S, Hirose T, Matsumura S, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Suzuki T, Masumura K, Sugiyama KI Effect of sequencing platforms on the sensitivity of chemical mutation detection using Hawk-Seq™. *Genes Environ.* 2024;46:20.
3. Corton JC, Auerbach SS, Koyama N., Mezencev R., Yauk CL., Suzuki T. Review and meta-analysis of gene expression biomarkers predictive of chemical-induced genotoxicity in vivo. *Environ. Mol. Mutagen.* 2025: doi: 10.1002/em.22646.
4. Froetschl R., Corton JC., Li H., Aubrecht J., Scott S. Auerbach SS., Caiment F., Doktorova TY., Fujita Y., Jennen D., Koyama N., Meier MJ., Mezencev R., Recio L., Suzuki T., Yauk CL. Consensus findings of an IWGT Workshop on using Transcriptomic Biomarkers to Predict Genotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 2025: doi: 10.1002/em.22645
5. 築茂由則, 吉田徳幸, 大岡伸通, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 米満研三, 上間匡,

本間正充, 合田幸広, 井上貴雄: 共通ウイルスゲノム RNA を用いた COVID-19 診断用核酸増幅検査薬の一斉性能評価試験. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2024:55:295-310.

6. Ikeuchi S, Hirose S, Shimada K, Koyama A, Ishida S, Katayama N, Suzuki T, Tokairin A, Tsukamoto M, Tsue Y, Yamaguchi K, Osako H, Hiwatashi S, Chiba Y, Akiyama H, Hayashidani H, Hara-Kudo Y. Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from the Surfaces of Beef Carcasses in Slaughterhouses in Japan. *J Food Prot.* 2024; 87:100263.

G-2. 学会発表

1. 鈴木孝昌 様々な EC-NGS 法の特徴 日本環境変異原ゲノム学会第 84 回 MMS 研究会, 東京都 (2024. 6)
2. 鈴木孝昌 Error-corrected next generation sequencing (ecNGS)の現状 第 51 回日本毒性学会学術年会 福岡市 (2024.7)
3. 鈴木孝昌, 尤馨悦, 伊澤和輝, 津田雅貴, 本間正充, 欒洋, 杉山圭一. PECC-Seq 法の開発から学ぶエラー修正 NGS(ecNGS)法の残存エラーの要因 第 83 回日本癌学会学術総会, 福岡市 (2024.9)
4. 鈴木孝昌, 西川可穂子. 河川水のメタゲノム解析による細菌叢と薬剤耐性

遺伝子の探索 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)

5. 鈴木孝昌, 杉山圭一. ナノポアシーケンサーを用いた簡便迅速な DNA メチル化解析手法の開発 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
6. 降旗千恵, 鈴木孝昌. In vivo トキシコゲノミクス試験に有用な 4 つの遺伝毒性マーカー遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, Cdkn1a) 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
7. 東航平, 鈴木孝昌, 青木康展, 山田雅巳. 魚類腸内細菌叢解析を用いた水環境中の界面活性剤のモニタリングに関する研究 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
8. “Error-corrected next-generation sequencing (NGS)” as an ultimate tool for genetic toxicology 第 47 回インド環境変異原学会年会 アンナマライ/インド (2025.1)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 特許取得

なし

J. 実用新案登録

なし

厚生労働省科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（分担）研究報告書

化学物質によるゲノム毒性等生体影響の最小化に関する検討

研究分担者 小泉 修一 | 山梨大学 医学部長・薬理学教授

研究要旨

ゲノム毒性最小化のために、ミクログリア移植技術を開発した。

研究分担者氏名・所属研究機関名及
び所属研究機関における職名

（分担研究報告書の場合は、省略）

A. 研究目的

ゲノム毒性最小化のための、ミクログリア移植技術の基礎条件の抽出及び実験条件の最適化を行う。

B. 研究方法

ミクログリアの移植には2つの方法を用いた。(1) 完全非侵襲的置換によるミクログリアの全脳置換：ミクログリアの経鼻移植。(2) 微侵襲的なミクログリアの局所的置換：ミクログリアの外科的移植、によるミクログリアの定着状況を解析し、実験条件を最適化する。

C. 研究結果

Colony stimulating factor1 受容体 (CSF1R) 拮抗薬のONにより、内在性ミクログリアを除去してから、CSF1R 拮抗薬をOFFにした翌日にミクログリアの経鼻移植、局所外科移植を行うことが必要条件であった。これにより、いずれの方法でも、移植後最低2ヶ月間は移植ミクログリアが正常に定着できることが明らかとなった。

D. 考察

ミクログリア移植技術を開発し、化学物質及び加齢により異常となったミクログリアを置換することが可能となった。今後、ゲノム毒性とミクログリア異常の因果関係解明、毒性発現メカニズム解明、ゲノム毒性最小化への応用が期待できる。

E. 結論

CSF1R 拮抗薬のON/OFFと(1) 経鼻移植、及び(2) 局所注入の組み合わせにより、ミクログリアは移植、置換することが可能である。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Shigetomi et al, Nat Commun,15, 6525, 2024. 他計6報（別紙4参照）

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

自然老化マウスの作出

研究分担者 柳井 修一 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター
東京都健康長寿医療センター研究所 専門副部長

研究要旨 来年度以降の研究で使用する老化動物を作出するため、ブリーダーから4週齢のマウスを購入し、長期飼育を開始した。一般的に「老齡」と考えられる24ヶ月齢を目安に飼育を継続する。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

（分担研究報告書の場合は、省略）

A. 研究目的

マウスが十分に老化するために必要な時間（約2年）は、老化動物を用いる際のボトルネックとなる。老化動物を作出し、研究代表者、分担者の要請に応じて提供することを目的とする。

B. 研究方法

ブリーダーから4週齢のマウスを購入し、適齢に達するまで一切の実験操作を行わずに長期飼育する。
（倫理面への配慮）
ケージ観察を毎日実施し、エンドポイントに達した動物の早期同定に努めるとともに、当該マウスは安楽殺を行う。

C. 研究結果

次年度以降に供出するために導入した4コホートは、20、17、13、10ヶ月齢に達した。20及び17ヶ月齢のコホートで各1匹が死亡した他、生存個体のうち数匹で下腹部膨満等の軽度異常所見が認められた。13及び10ヶ月齢のコホートでは異常所見は認められず、死亡した個体もいなかった。

D. 考察

マウスでは生存曲線が老化の指標の一つ

とされている。自然死する個体が出始めたことから、老化が進行していると考えられる。

E. 結論

一般的に「老齡」と考えられる24ヶ月齢を目安に飼育を継続する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ S. Kakizawa, T. Arasaki, A. Yoshida, A. Sato, Y. Takino, A. Shigami, T. Akaike, S. Yanai, S. Endo. *Redox Biology*, 70, 103053 (2024)
・ T. Shintani, S. Yanai, A. Kanasaki, T. Iida, S. Endo. *Experimental Gerontology*, 196, 112555 (2024)

2. 学会発表

・ S. Yanai, T. Arasaki, S. Endo. Assessment of physical and cognitive decline in aging mouse model. 第47回日本基礎老化学会大会 (2024. 6. 15-16) 他7件（別紙4参照）

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

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

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
Sugiyama K*, Grúz P, Sato K, Honma M. p. in press.	Effects of carminic acid on gene expressions under epigenetic regulation.	Biochem Biophys Res Commun.			in press
*佐藤 薫, 高橋裕次, 鈴木郁朗	in vivo イメージングと MPS 導入による非臨床評価系の予測性向上の可能性—中枢神経系痙攣リスク予測と吸入薬の肺胞送達を例として.	YAKUGAKU ZASSHI			in press
Nakayama-Kitamura K, Shigemoto-Mogami Y, Piantino M, Nakayama Y, Yamada A, Kitamura S, Furihata T, Matsusaki M, *Sato K.	Collagen I Microfiber Promotes Brain Capillary Network Formation in Three-Dimensional Blood-Brain Barrier for Microphysiological Systems.	Biomedicines.	12 (11)	10.3390/biomedicines12112500.	online 2024
Shigemoto-Mogami Y, Nakayama-Kitamura K, *Sato K.	The arrangements of the microvasculature and surrounding glial cells are linked to blood-brain barrier formation in the cerebral cortex.	Front Neuroanat.	18	1438190.	online 2024,
Takahashi K, *Sato K.	The conventional and breakthrough tool for the study of L-glutamate transporters.	Membranes.	14,	77.	online 2024
Furuhama, A., Sugiyama, K. and Honma, M.	Ames mutagenicity of 15 aryl, benzyl, and aliphatic ring N-nitrosamines.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	156	105763	https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2024.105763 2025

Muto, S., Furuhamada, A., Yamamoto, M., Otagiri, Y., Koyama, N., Hitaoka, S., Namigato, Y., Ouchi, H., Ogawa, M., Shikano, K., Yamada, K., Ono, S., Hoki, M., Ishizuka, F., Hagio, S., Takeshita, C., Omori, H., Hashimoto, K., Chikura, S., Honma, M., <u>Sugiyama, K.</u> and Mishima, M:	Local QSAR based on quantum chemistry calculations for the stability of nitrenium ions to reduce false positive outcomes from standard QSAR systems for the mutagenicity of primary aromatic amines.	Genes and Environ	46, 24.	https://doi.org/10.1186/s41021-024-00318-4	2024
Parsons BL, Beal MA, Dearfield KL, Douglas GR, Gi M, Golapudi B, Heflich RH, <u>Horibata K</u> , Kenyon M, Long AS, Lovell D, Lynch AM, Myers MB, Pfuhler S, Vespa A, Zeller A, Johnson G, White PA.	Severity of Effect Considerations Regarding the Use of Golap Mutation as a Toxicological Endpoint for Risk Assessment: A Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT).	Environmental and Molecular Mutagenesis.			in press
Shimizu N, <u>Izawa K</u> , Washif M, Morozumi R, Hirota K, Tsuda T:	Role of TDP2 in the repair of DNA damage induced by the radiomimetic drug Bleomycin.	Genes Environ.	28:47(1):7.	online	2025
Iso, T., <u>Suzuki, K.</u> , Murata, Y., Hirose, N., Umamo, T., <u>Horibata, K.</u> , <u>Sugiyama, K.</u> , Hirose, A., Masumura, K. and Matsumoto, M:	Lack of in vivo mutagenicity of carbendazim in the liver and glandular stomach of MutaMice.	Genes and Environ	46, 7.	https://doi.org/10.1186/s41021-024-00299-4	2024
Parsons BL, Beal MA, Dearfield KL, Douglas GR, Gi M, Golapudi B, Heflich RH, <u>Horibata K</u> , Kenyon M, Long AS, Lovell D, Lynch AM, Myers MB, Pfuhler S, Vespa A, Zeller A, Johnson G, White PA.	Severity of Effect Considerations Regarding the Use of Golap Mutation as a Toxicological Endpoint for Risk Assessment: A Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT).	Environmental and Molecular Mutagenesis.		Online ahead of print.	2024
Furihata C., <u>Suzuki T.</u>	Four functional genotoxic marker genes (Bax, Btg2, Ceng1, and Cdkn1a) discriminate genotoxic hepatocarcinogens from non-genotoxic hepatocarcinogens and non-genotoxic non-hepatocarcinogens in rat public toxicogenomics data, Open TG-GATE.	Genes Environ.	46: 28.	online	2024;

Hosoi S, Hirose T, Matsumura S, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, <u>Suzuki T</u> , Masumura K, <u>Sugiyama K</u> .	Effect of sequencing platforms on the sensitivity of chemical mutation detection using Hawk-Seq™.	Genes Environ.	46:20.	online	2024
Corton JC, Auerbach SS, Koyama N., Mezencev R., Yauk CL., <u>Suzuki T</u> .	Review and meta-analysis of gene expression biomarkers predictive of chemical-induced genotoxicity in vivo.	Environ. Mol. Mutagen.			in press
Froetschl R., Corton JC., Li H., Aubrecht J., Scott S. Auerbach SS., Caiment F., Doktorova TY., Fujita Y., Jennen D., Koyama N., Meier MJ., Mezencev R., Recio L., <u>Suzuki T</u> , Yauk CL.	Consensus findings of an IWGT Workshop on using Transcriptomic Biomarkers to Predict Genotoxicity.	Environ. Mol. Mutagen.			in press
築茂由則, 吉田徳幸, 大岡伸通, 内田恵理子, 銚本孝昌, 米満研三, 上間匡, 本間正充, 合田幸広, 井上貴雄:	共通ウイルスゲノムRNAを用いたCOVID-19診断用核酸増幅検査薬の一斉性能評価試験.	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス.	55	295-310	2024
Ikeuchi S, Hirose S, Shimada K, Koyama A, Ishida S, Katayama N, <u>Suzuki T</u> , Tokairin A, Tsukamoto M, Tsue Y, Yamaguchi K, Osako H, Hiwatashi S, Chiba Y, Akiyama H, Hayashidani H, Hara-Kudo Y.	Isolation of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli from the Surfaces of Beef Carcasses in Slaughterhouses in Japan.	J Food Prot.	87:100263.	online	2024
Kim SH, Lee J, Jiang M, Roh SE, Kim S, Lee JH, Seo J, Bae J, Hwang JY, Bae IS, Lee YS, Shigetomi E, Lee CJ, <u>Koizumi S</u> , *Kim SK and *Kim SJ.	Cerebellar Bergmann glia integrate noxious information and modulate nociceptive behaviours.	Nat Neurosci,	Online ahead of print (Jan. 02)	doi: 10.1038/s41593-024-01807-z.	2025
Kobayashi Y, Sakai K, Tran NQV, Ishimaru K, Sato T, Nakamura Y, Nakagomi D, Tanaka S, <u>Koizumi S</u> and Nakao A.	IL-33 sensitizes mast cells to PIEZO1 stimulation leading to degranulation.	Allergy,	79.	3517-3520. doi:10.1111/all.16397	2024

Kubota Y, Shigetomi E, Saito Ko, Shinozaki Y, Kobayashi K, Tanaka M, Bijay P, Tanaka KF, and * <u>Koizumi S.</u>	Establishment and Use of Primary Cultured Astrocytes from Alexander Disease model mice.	Int J Mol Sci.	25(22), 12100.	online Doi:10.3390.ijms252212100	2024
Shigetomi E, Suzuki H, Hirayama YJ, Sano F, Yoshihara K, Koga K, Tateoka T, Yoshioka H, Shinozaki Y, Kinouchi H, Tanaka KF, Bito H, Tsuda M and * <u>Koizumi S.</u>	Reactive astrocytes enhance neuronal excitability via IGF2BP2: pathological effects of P2Y1 receptor upregulation.	Nat Commun	15,	6525.	(2024)
Parajuli B and * <u>Koizumi S.</u>	Unexpected role of microglia and P2Y12 in the induction of and emergence from anesthesia.	Purinergic Signaling	20(6).	573-575.	2024
Hirayama Y, Le NGH, Hashimoto H, Ishihara I, <u>Koizumi S.</u> , and *Anzai N.	Preconditioning-induced facilitation of lactate release from astrocytes is essential for brain ischemia tolerance.	eNeuro.	11(4).	ENEURO.0494-23.2024. doi:10.1523/ENEURO.0494-23.2024	(2024)
S.Kakizawa, T.Arasaki, A.Yoshida, A.Sato, Y.Takino, A.shigami, T.Akaike, S.Yanai, S.Endo.	Essential role of ROS - 8-Nitro-cGMP signaling in long-term memory of motor learning and cerebellar synaptic plasticity.	Redox Biology.	70, 103053.	online	2024
T.Shintani, S.Yanai, A.Kanasaki,T.Iida, S.Endo.	Long-term d-allose administration ameliorates age-related cognitive impairment and loss of bone strength in male mice.	Experimental Gerontology.	196, 112555	online	2024

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

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 化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および in vitro リスク評価法開発のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター薬理部 第一室長
(氏名・フリガナ) 佐藤 薫・サトウ カオル

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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<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：)

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

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 化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および in vitro リスク評価法開発のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター薬理部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 最上 由香里・モガミ ユカリ

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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<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：)

令和7年3月31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

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 化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および in vitro リスク評価法開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) ゲノム安全科学部・部長
(氏名・フリガナ) 杉山圭一・スギヤマケイイチ

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 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

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 化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および in vitro リスク評価法開発のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) ゲノム安全科学部・室長
(氏名・フリガナ) 堀端 克良 ホリバタ カツヨシ

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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<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。

令和7年3月31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

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 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

2. 研究課題名 化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および in vitro リスク評価法開発のための研究

3. 研究者名（所属部署・職名） ゲノム安全科学部 主任研究官

（氏名・フリガナ） 伊澤 和輝・イザワ カズキ

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：)

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

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 化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および in vitro リスク評価法開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) ゲノム安全科学部・主任研究官

(氏名・フリガナ) 鈴木 孝昌・スズキ タカヨシ

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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<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。

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 山梨大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 中村 和彦

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 令和6年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および in vitro リスク評価法

開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院総合研究部医学域 薬理学講座・教授

(氏名・フリガナ) 小泉修一・コイズミシュウイチ

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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	山梨大学	<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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	山梨大学	<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。

令和7年 5 月 12 日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
~~(国立保健医療科学院長)~~

機関名 地方独立行政法人
東京都健康長寿医療センター

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 秋下雅弘

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。

- 研究事業名 厚生労働省科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)
- 研究課題名 化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および in Vitro リスク評価法開発のための研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 東京都健康長寿医療センター研究所・専門副部長
(氏名・フリガナ) 柳井修一・ヤナイシュウイチ

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 無 (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。