

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）7 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 薫

（令和）8（2026）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. 化学物質による体細胞突然変異検出法の開発 -----	12
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	
2. 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 -----	16
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	
3. 転写に関連した突然変異生成の解析 -----	23
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	
4. 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 -----	29
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	
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 -----	40
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	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	43
----------------------------------	----

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

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

一研究要旨一

近年、化学物質等が細胞分裂を伴うことなく、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. 化学物質による体細胞突然変異検出法の開発

前年度までのプロトコルの改良に加え、本年度のライブラリ作製試薬の検討・変更によって、より DNA の損失を抑え、少量 DNA から ECS 解析ライブラリを作製するプロトコルを作成した。本課題でモデル細胞とする老齢神経細胞・ミクログリアについて、細胞分取後、細胞を集積・DNA を抽出する条件について検討し、同一サンプルから ECS 解析とメチル化解析を行うために十分な量の DNA が抽出できるプロトコルを確立した。それぞれのサンプルから ecNGS 解析用のライブラリを作製した。実際に老齢、若齢神経細胞サンプルの ecNGS 解析を行ったが、老齢サンプルにおける変異頻度上昇を検出するにはさらなるサンプル数が必要であることが示唆された。すなわち、老化細胞においては、N=3 で有意差がつくほどの劇的な体細胞突然変異は見られないことがわかったが、例数をあげることで有意差がつく微細な変異が起こっている可能性が示唆された。

2. 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

ナノポアシーケンサーを用いたメチル化解析法を用いて、老齢、若齢マウス神経細胞、ミクログリアのグローバルメチル化レベルを簡便迅速に解析することができた。老齢／若齢間のグローバルメチル化レベルでは神経細胞、ミクログリアとも大きな差がなかった。しかし、神経細胞／ミクログリア間では老齢、若齢、ともにミクログリアのメチル化が低い傾向を見いだした。

3. 転写に関連した突然変異生成の解析

ROS により S 期進行を抑制した条件下においても、DOX 添加による転写誘導により gpt 変異体頻度が上昇することを明らかにした。この結果は、DNA 複製の寄与が低下した条件下でも、転写誘導に関連した突然変異生成が生じ得ることを示唆している。一方、アルキル化剤 ENU を処理した条件では、ENU による gpt 変異体頻度の上昇は認められたものの、DOX 添加による転写誘導が ENU 誘発変異体頻度を明確に増強する傾向は認められなかった。したがって、今回の ENU 処理条件では、ENU 誘発突然変異に対する転写誘導の影響は限定的である可能性が示された。以上より、CHO/TAM 解析系は、細胞分裂抑制条件下における転写関連突然変異生成を解析するための有用な実験系であると考えられた。今後は TAM の検出条件およびその機構をより詳細に明らかにする。

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

老齢神経細胞と老齢ミクログリアにおいて、細胞老化度等の脆弱性が亢進している可能性が示された。今後得られる scRNAseq データと共に、体細胞変異、エピジェネティクス異常と関連があるかどうかについても検討し統合することにより、的確なゲノム毒性評価系を確立する予定である。

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

老齢ミクログリアは数・形態・機能が大きく低下していた。また、老齢ミクログリア独自の置換法開発も必要であることがわかった。

自然老化マウスの提供

次年度の研究実施に向け、複数コホートのマウスの飼育を継続する。また、定期的な病原微生物検査や健康観察も引き続き実施し、清浄環境の維持、並びに個体の健康状態の適切な管理に務める。

来年度への展望

老齢/若齢マウスの神経細胞、ミクログリアにおいて、細胞老化等の細胞脆弱性マーカーが検出され、ミクログリアの体細胞突然変異が増加傾向を示したが、N=3 で有意な差がつくほどの大きな影響はないことが示された。老齢動物における細胞老化等、細胞脆弱性とゲノム脆弱性との関連については定量性が得られる特徴量を見いだしてまとめることを目的として次年度取り組む。中間評価ヒアリングでは、化学物質影響の評価にシフトすることを推奨された。当班では今年度までに、ゲノム脆弱性（体細胞突然変異、エピジェネティクス変異）の検出系を確立した。そこで、R8 には神経細胞系細胞株を採用し、増殖期、静止期における化学物質影響評価を行うこととした。陽性/陰性対象化学物質、PFOS 等の化学物質選択については、OECD ガイドラインのうち、哺乳類動物細胞を用いた in vitro 評価系で指定されている化学物質を選択することとした。

研究分担者

杉山圭一（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）
堀端克良（国立医薬品食品衛生研究所）
最上由香里（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と、それに伴う細胞性状変化を検討可能なゲノム毒性検出法を確立する。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にはゲノム毒性が蓄積していると思込まれる。そこで、老齢動物からこれらの細胞を分取しモデル細胞として使用し、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の検出技術を確認する。体細胞突然変異やエピジェネティクス異常は細胞老化度と関連していることが報告されていることから (Miller et al., 2022)、細胞老化度等の細胞脆弱性亢進の評価法も確立し、ゲノム不安定性評価と統合する。加えて、化学物質影響としてのゲノム毒性を検証する。以上の検討を総括し *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、ゲノム毒性一細胞老化等脆弱性との関連検討、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. 化学物質による体細胞突然変異検出法の開発

① DNA 抽出条件の検討

Miltenyi Biotec 社の MACS により分取されたマウスの神経細胞・ミクログリア細胞サンプルについて、細胞回収時の遠心速度などの条件を複数用意し、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Netherlands) を用いて DNA を抽出した。

② DNA 断片分子確保プロトコル最適化・ライブラリ作製

前年度行ったライブラリ作製プロトコルの改良に加え、本年度は酵素による断片化とニック処理の後工程を変更した。別課題において、既存プロトコルと比較して、よりステップが少なく 1 チューブで反応させることができる NEBNext® Ultra™ II DNA PCR-free Library Prep Kit for Illumina® のキットを用いる事によりさらに DNA の損失を抑えながら ecNGS 解析用のライブラリを作製できることが明らかとなっていた。そこで、本研究においても PECC-Seq 法におけるライブラリ作製プロトコルについてこれを採用した。ゲノム DNA 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 Nuclease P1 (New England Biolabs, 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 NEBNext® Ultra™ II DNA PCR-free Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs, 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。シーケンスには国立医薬品食品衛生研究所設置の NextSeq2000 (Illumina, Inc., USA) を用いた。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、公開されているマウスのゲノム配列 (GRCm39) 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。ECS 解析手法としては PECC-Seq を用いた。

2. 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

グローバルメチル化の評価に関しては、ナノポアシーケンサーを用いたメチル解析法を用いた。本解析法は研究分担者が確立した手法であり簡便迅速という利点がある。本研究班では、5 週令及び 84 週令の C57BL/6 マウスの脳、肝臓、腎臓における DNA メチル化について検討した。部位特異的なメチル化の検討に向けて、老化によりメチル化レベルの変化することが知られている Epigenetic clock 遺伝子のマウスにおける報告を調べ、ゲノム上の位置をリストアップした。

3. 転写に関連した突然変異生成の解析

これまでに樹立している CHO/TAM 解析系で用いる CHO-KTG5 細胞株を用いた。本細胞株は、突然変異解析の標的遺伝子である大腸菌 *gpt* 遺伝子を含む *gpt* カセットを有する λ ファージ DNA コンストラクトを、CHO Tet-On 3G 細胞に安定導入して作製したものである。本解析系では、Tet 応答性プロモーターの下流に *gpt* カセットが配置されており、ドキシサイクリン (DOX) 添加により *gpt* カセット上の転写を誘導することができる。転写誘導後、細胞ゲノム DNA 中に組み込ま

れたλファージ DNA 領域を in vitro packaging により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ることでプラスミド化し、gpt アッセイにより標的遺伝子上に生じた突然変異を解析する。前年度、CHO/TAM 解析系で接触阻害や無血清培養では細胞分裂活性が十分には抑制されない一方、ALLN または Roscovitine 処理により S 期進行を抑制できる条件を見出しており、本年度はその条件を TAM 解析へ適用した。具体的には、CHO-KTG5 細胞株に対して Roscovitine (ROS) を 20 μM の濃度で 16 時間事前処理し、S 期進行を抑制した。また、比較対照として ROS を事前処理しない群も設定した。その後、ROS 存在下または非存在下で、遺伝毒性物質であるエチルニトロソウレア (ENU; Ethylnitrosourea) を 12 μg/mL の濃度で 4 時間処理した。さらに、ENU 処理後、ROS 存在下または非存在下で DOX を 1 μg/mL の濃度で 20 時間処理し、gpt カセット上の転写を誘導した。これにより、S 期進行抑制の有無、アルキル化剤処理の有無、および転写誘導の有無を組み合わせた処理群を設定し、各条件が gpt 遺伝子変異体頻度に及ぼす影響を解析した。

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

細胞単離

若齢マウス (C57BL/6J 3 ヶ月齢, ♂)、老齢マウス (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。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。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。

ポピュレーション解析

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、Viability 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、CD45-FITC、CD11b-PE、TMEM119-CoraLite647、Viability 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。

ミクログリア培養

神経細胞陰性分画を、Poly-L-Lysine (10 μg/mL, 3 時間、室温; P9155, Sigma-Aldrich) でコートした T25 フラスコに播種した。培地は、10% 牛胎児血清および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (15140-122, Gibco) を含む DMEM/F12 (11965-092, Gibco; 11765-054, Gibco) を基礎

培地とし、マクローファージコロニー刺激因子 (M-CSF, 10 ng/mL, 315-02, PeproTech) およびトランスフォーミング増殖因子 β1 (TGF-β1, 50 ng/mL, 100-21, PeproTech) を添加した。培地は 2~3 日に 1 回交換し、3~4 週間培養後、フラスコを振幅約 20 cm で毎分 60 回程の早さで 1-2 分間振盪し、回収した培地中の細胞を Poly-L-Lysine コート 8 well chambered coverslip (80826, ibidi) に播種した。

免疫細胞染色

8 well チャンバーに播種後、ミクログリア用培養プロトコル用いて 1 日間培養した細胞標本を、ミクログリアマーカー Iba1 (1:500, 090-19741, Wako) 及び Hoechst の 2 重染色を行った。免疫染色後の標本は、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。

免疫組織染色

マウスを深麻酔下で心灌流し脱血した後、4% PFA により灌流固定を行った。脳を摘出し、4% PFA 中で一晩固定した後 30% sucrose 溶液で置換し、OCT-compounds に包埋した。クライオスタット (CM3050, Leica) を用いて、30 μm スライス切片を作成しスライドに接着させ、スライス標本作製した。スライス標本は、必要に応じ、熱賦活化抗原開示処理を行った。その後、0.3% TritonX、3% Goat Serum-PBS 中にて室温 3 時間インキュベーションし、一次抗体 (Anti-MAP2, 1:100, Anti-Iba1, 1:500, Anti-CD68, 1:100, Anti-LaminB1, 1:10000, Anti-p21, 1:1000) にて 4°C 16 時間インキュベートした。洗浄後、二次抗体 (Anti-rabbit or mouse IgG, 1:1000) にて室温 2 時間インキュベーションした後、洗浄後 DAPI (1:1000) でカウンターステインした。洗浄した後、切片を乾燥させ蛍光退色保護剤を滴下し、カバーガラス内に封入した。LaminB1、p21 は、Tris-EDTA バッファー (pH 9.0) を用いた熱媒介抗原回収を実施した。染色画像は共焦点レーザー顕微鏡システム A1R (Nikon) を用いて撮像し、NIS-Element を用いて解析を行った。

β-Galactosida (SA-β-Gal) 染色

SA-β-Gal 染色は、Senescence β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology) を用いて実施した。厚さ 30 μm の凍結脳薄切標本に β-Galactosidase Staining 溶液を滴下し、37°C で 24 時間インキュベーションした。その後、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE) を用いて撮影を行った。

シングルセルトランスクリプトーム解析 (Flex サンプル作成)

若齢、老齢マウス由来神経細胞および若齢、老齢マウス由来ミクログリアは、各群 9 匹のマウスより採材し、プールした。単離した神経細胞およびミクログリア細胞は GEM-X Flex Sample Preparation v2 Kit (PN-1000781, 10X GENOMICS)

を用いて固定化した。固定化細胞はPIを用いてセルカウントした後、Stock 溶液中に細胞を分散し、-80℃にて凍結保存した。作成したFlex サンプルは、タカラバイオ遺伝子解析センターに送付し、Chromium GEM-X Fixed RNA ライブラリー作成、NovaSeq シークエンス、Cell Ranger を用いたシングルセル発現解析を実施した。

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

24 ヶ月齢の老齢マウスを用いた。ミクログリアの形態解析は、Iba1 抗体を用いて行った。またミクログリア置換のための、ミクログリア除去はCology stimulating factor-1 受容体(CSF-1R)拮抗薬のPLX3397 (1,200ppm) を餌に混ぜて、2 週間投与することで行った。

自然老化マウスの提供

ブリーダーから 4 週齢のマウスを購入し、適齢に達するまで長期飼育を行った。飼育環境は温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクルとして、1 ケージあたり 4~5 匹で群飼育を行った。飼料と水は自由摂取とした。品質管理のためケージ観察を毎日実施し、外観異常や行動異常などの健康状態を継続的に確認した。顕著な病理所見が見受けられた個体は解析対象から除外するとともに、エンドポイントに達した場合は速やかに安楽致死処置を施し、動物福祉へ配慮した。また、清浄度の維持・監視のため、飼育動物を用いた病原微生物検査を 3 ヶ月に一度の頻度で実施した。検査対象はサルモネラ菌やLCM ウィルスなどの人獣共通感染症に加え、日和見感染症関連病原体や飼育環境の指標となる 15 種の微生物とした。長期飼育を実施するコホートについて、当センターが保有する老化マウスの生存曲線や病理所見発症率と比較検討を行い、飼育条件および個体特性の妥当性を評価した。老齢マウスが 23 ヶ月齢、若齢マウスが 2 ヶ月齢に達した時、合計 3 コホートのマウスを国立医薬品食品衛生研究所と山梨大学へ輸送し、研究に供した。

(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. 化学物質による体細胞突然変異検出法の開発

①DNA抽出条件および分取細胞数と抽出DNA濃度

DNA抽出条件の検討の結果、1000Gの遠心速度で

5分間遠心をした場合に解析十分量 (>100ng) のDNAが回収可能であることが明らかとなった。ECS解析とメチル化解析を同一個体から得られたサンプルを用いて行うため、十分なDNA量が見込めるサンプルを採用した。またこれらのサンプルについてはメチル化解析班に分与した。

②ライブラリ濃度

上記サンプルについて100 ng~300 ng程度のDNAを用いて改良したプロトコルによりライブラリを作製した。一部のサンプルにおいて得られたライブラリ濃度が一般的なNGS受託解析の濃度である5nMを下回ったが、他のサンプルでは5nM以上のライブラリが得られた。

③ECS解析結果

若齢神経細胞サンプル No. 13、14、15、および老齢神経細胞サンプル No. 08、13、14 についてECS解析を行った。解析の結果、若齢神経細胞において平均 3.7×10^{-8} 、老齢神経細胞において平均 2.6×10^{-8} と変異頻度が計算された。統計解析の結果、若齢と老齢サンプル間で有意な変異頻度差が見られなかった。若齢ミクログリア細胞サンプル No. 4、5、10 および老齢ミクログリア細胞サンプル No. 04、05、11 についてECS解析を行った。解析の結果、若齢ミクログリア細胞において平均 7.9×10^{-8} 、老齢神経細胞において平均 11.0×10^{-8} と変異頻度が計算された。老齢サンプルにおいて、変異頻度の上昇傾向が見られたものの、統計解析の結果、若齢と老齢サンプル間で有意な変異頻度差が見られなかった。

サンプル間の比較においては、神経細胞サンプルよりもミクログリアサンプルの方が回収できるDNA量が多い傾向が示唆された。これは神経細胞がほぼ分裂しない一方で、ミクログリアは速度が非常に遅いものの、分裂能があることに由来すると考えられた。これまでの採材において、マウス各個体から 1×10^5 以上の神経細胞およびミクログリアが回収できており、これらのサンプルからecNGS解析およびメチル化解析に十分なDNA量が回収可能であることが明らかとなった。若齢・老齢の神経・ミクログリア細胞における変異頻度の比較について、本年度はそれぞれ3サンプルずつの比較を行った。その結果、老齢個体において、変異頻度の有意な上昇は見られなかった。先行研究として、脳における変異頻度を遺伝子改変マウスを用いて算出した報告があるが (Zhang et al., *Annu Rev Genet.* 2018, Dollé et al., *Nat Genet.* 1997)、細胞老化に伴う変異頻度上昇は微量かつ個体間のバラつきが大きいことが示されている。そのため老齢個体における変異頻度上昇を検出するには、さらに例数を上げて統計解析を行う必要があることが示唆された。一方で、遺伝子改変マウスよりも精緻に変異頻度を検出可能なECS解析を用いていることから、従来よりも少ない使用動物数での議論が可能であることが期待される。老化細胞においては、N=3で有意差がつく

ほどの劇的な体細胞突然変異は見られないことがわかったが、例数をあげることで有意差がつく微細な変異が起こっている可能性が示唆された。

2. 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

老齢および若齢マウスの神経細胞とミクログリアのDNAメチル化 (5-methyl C及び5-hydroxymethyl C) レベルを調べた結果、CpGサイトのメチル化は50-60%であり、両者に大きな差は見られなかった。CpGサイトに限定しない場合にも同様の傾向が見られたが、そのレベルは10%以下と低く、DNAのメチル化は主にCpGサイトで起きることが確認できた。また、神経細胞—ミクログリアの比較では、若齢、老齢ともに神経細胞に比べてミクログリアのメチル化レベルが低い傾向が見られた。考察のため、5週令及び84週令のC57BL/6マウスの脳、肝臓、腎臓におけるDNAメチル化も検討した。これらの臓器においても、週齢による明らかな差は認められなかった。従って、DNAメチル化に関しては特定部位について解析する必要があることがわかった。今後は、その有力な候補として、LINE-1配列やepigenetic clock遺伝子のメチル化レベルの解析を行う予定である。この解析に向けて、マウスにおけるエピジェネティッククロック遺伝子に関する情報を調べ、それらをゲノム上の位置情報と共にリストアップした。一般的に、老化によりゲノムDNAのメチル化レベルの変化が起きることが知られており、特定遺伝子のメチル化レベルは、epigenetic clockとして、細胞年齢の推定に利用できる。今後の解析に向けて、マウスにて報告されているepigenetic clock遺伝子を調べ、それらのマウスゲノム上での位置情報を取得した。今回の検討では特定の遺伝子ではなくゲノム全体のグローバルなメチル化の変化を解析したため、大きな変化は検出できなかったと考えられる。ただし、神経細胞とミクログリアの間でメチル化レベルの差が見られたことは重要な新知見である。神経細胞とミクログリアの細胞起源が大きく異なる点や、各細胞の生理学的機能との関連が示唆される。特にミクログリアは脳神経系において、外部影響を最初に受ける細胞であるため、in vitro評価系に最適な細胞選択において考慮する点となり得る。一方で、ゲノム不安定性のバイオマーカーとして、特定遺伝子のメチル化状態に注目するべきかもしれない。シーケンズデータのマッピングを行いゲノム上の位置情報を得たのちに、LINE-1やepigenetic clock遺伝子などの特定部位のメチル化の変化を検出したいと考えている。

3. 転写に関連した突然変異生成の解析

CHO-KTG5 細胞株を用いた TAM 解析において、各処理条件下で gpt 遺伝子変異体頻度を解析

した。細胞周期阻害剤を処理せず、かつ ENU も処理しない条件では、DOX 添加により gpt 変異体頻度に弱い上昇が認められた。この結果は、DOX による gpt カセット上の転写誘導が、gpt 遺伝子上の突然変異生成を促進し得ることを示唆する。ROS 単独処理群では、処理なし群と比較して gpt 変異体頻度の上昇が認められた。また、ROS 処理条件下においても、DOX 添加により gpt 変異体頻度がさらに上昇した。これは、ROS により S 期進行を抑制した条件下においても、gpt カセット上の転写誘導に伴い突然変異頻度が上昇し得ることを示す結果であった。一方、ENU 処理群では、細胞周期阻害剤を処理しない条件において、ENU 処理により gpt 変異体頻度の明確な上昇が認められたが、DOX 添加によってさらに変異体頻度が上昇する傾向は認められず、むしろわずかな低下が見られた。S 期進行抑制条件下においても、アルキル化剤である ENU による突然変異誘発性が認められることが示唆された。しかしながら、ROS および ENU の併用条件下では、DOX 添加による gpt 変異体頻度の明確な変化は認められなかった。以上の結果から、CHO/TAM 解析系において、S 期進行を抑制した条件下でも転写誘導により gpt 変異体頻度が上昇することが示された。一方、今回の ENU 処理条件下では、DOX 添加による転写誘導が ENU 誘発突然変異を明確に増強する傾向は認められなかった。ROS による S 期進行抑制条件下でも DOX 添加により gpt 変異体頻度が上昇したことは、DNA 複製の寄与を相対的に低下させた条件下においても、転写誘導に関連した突然変異生成が生じ得ることを示唆している。TAM は、細胞分裂が乏しい組織・細胞において突然変異が生じる機構を理解するうえで重要な概念であり、本結果は、CHO/TAM 解析系がその解析に有用であることを示すものである。一方、ROS 単独処理により gpt 変異体頻度が処理なし群よりも上昇した点については、慎重な解釈が必要である。ROS は S 期進行抑制を目的として使用しているが、細胞周期制御以外の細胞内反応にも影響を及ぼす可能性も考慮する必要がある。ROS 以外の S 期進行阻害条件との比較、処理濃度および処理時間の最適化、細胞毒性および細胞周期状態の詳細な確認を行うことで、S 期抑制条件下での TAM の寄与をより明確に評価する必要があるであろう。ROS と ENU の併用条件では、ROS 単独処理よりも高い gpt 変異体頻度が認められたことから、S 期進行抑制条件下でも ENU による高い突然変異誘発性が見られることが示唆された。しかしながら、ENU 単独処理と ENU + DOX 処理を比較した場合、DOX 添加による gpt 変異体頻度の明確な上昇は認められなかった。同様に、ROS による S 期進行抑制条件下でも、ENU 処理と ENU + DOX 処理の間で gpt 変異体頻度に大きな差は見られなかつ

た。したがって、今回の ENU 処理条件では、DOX 添加による転写誘導が ENU による突然変異誘発性を明確に増強するとは判断できなかった。この理由として、ENU による DNA アルキル化損傷は、DNA 複製時のミスインコーポレーションにより突然変異として固定される寄与が大きく、今回の条件では転写誘導に伴う変異生成の寄与が ENU による変異誘発の背景に埋もれた可能性がある。今後は、ENU 以外の作用機序を有する遺伝毒性物質、異なる DNA 損傷型、転写誘導のタイミング、S 期抑制条件の違いを比較することで、化学物質誘発性 TAM の検出条件を明確化する必要がある。

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

脱血後脳サンプルは、氷冷下において前脳領域を摘出し秤量した。体重は、若齢マウスと比較して老齢マウスでは 37.4% 増大しているのに対し、前脳領域の重量は、ほとんど変化していなかった。前年度確立した細胞分散単離プロトコルに基づいて、マウス前脳より神経細胞、ミクログリアを単離した。いずれの細胞も生存率は 95% 以上であった。単離した神経細胞、ミクログリアの細胞数、純度を MACSQuant Analyzer10 で検証したところ、若齢マウス神経細胞は細胞数 1.23×10^5 、純度 96.48%、老齢マウス神経細胞数は 5.84×10^4 、純度 96.58% であり高い純度が確認された。そのうち NeuN 陽性細胞（注：神経細胞の核タンパク質であるが、全ての神経細胞が陽性ではない）は、若齢マウスで 87.47%、老齢マウスで 84.23% であった。一方、若齢マウスミクログリアでは、細胞数 1.83×10^5 、純度 92.23%、老齢マウスミクログリアは細胞数 1.56×10^5 、純度 92.48% であった。ミクログリア特異的マーカー TMEM119 陽性細胞（血中マクロファージは発現していない）は、若齢マウスで 70.99%、老齢マウスで純度 74.91% であった。上記の結果は 3 回の実験で再現性を確認した。回収細胞は、①ゲノム毒性検出系確立グループへの提供、②シングルセルトランスクリプトーム解析、③細胞培養に使用した。加えて、同週齢動物の④免疫組織染色を行った。

① ゲノム毒性評価

ゲノム毒性検出系グループへ若齢マウス神経細胞 8 例、ミクログリア 5 例を、老齢マウス神経細胞 8 例、ミクログリア 5 例を細胞懸濁液として提供した。

② シングルセルトランスクリプトーム解析

単離した細胞をシングルセルレベルで細胞性状解析するため、シングルセルトランスクリプトーム解析を実施した。上記のように単離した神経細胞、ミクログリアを GEM-X Flex Sample Preparation v2 Kit を用いて、4℃で 23 時間固定した。固定した神経細胞、ミクログリアは PI 染色し

て細胞核数をカウントした後、-80℃保存した。

GEM-X Flex シングルセルゲノム解析は、神経細胞（若齢マウス 9 個体より 1.51×10^6 細胞、老齢マウス 9 個体より 1.22×10^6 細胞）、ミクログリア

（若齢マウス 9 個体より 3.57×10^6 細胞、老齢マウス 9 個体より 3.80×10^6 細胞）ともにタカラバイオ株式会社遺伝子解析センターに委託し、生データセットを得た。今後、高次解析を行い、老齢マウスにあらわれる細胞性状と体細胞変異・エピジェネティクス変化を紐付けていく予定である。

③ 細胞培養

若齢および老齢マウス由来ミクログリア細胞を用いた *in vitro* 評価系の構築を目的として、ゲノム解析に使用しない細胞の培養プロトコルの整備を行った。4 週間培養後、振盪操作により回収した培地中の細胞を免疫染色した結果、若齢マウスでは 1.47×10^5 細胞、老齢マウスでは 5.2×10^4 細胞の Iba1 陽性ミクログリアが確認出来た。

④ 免疫組織染色

in vivo において神経細胞とミクログリアの細胞老化等の細胞性状変化を評価するため、免疫組織染色を行った。若齢マウス 5 例、老齢マウス 4 例の固定脳サンプルより凍結スライス切片を作成し、神経細胞、ミクログリアの選択的マーカー抗体および細胞老化等を検出する抗体を用いて免疫染色を行った。観察領域は神経細胞とミクログリアの判別が容易な海馬領域に注目した。MAP2 は微小管を調節するチューブリンタンパク質であり、神経細胞の細胞体、樹状突起に発現する。若齢マウスの海馬 CA1、DG 領域では、神経細胞の構造が明確であった。一方、老齢マウスでは、MAP2 シグナルが減弱し、突起構造が不連続になっていた。Iba1 は単球やマクロファージで発現する Ca^{2+} 結合蛋白タンパク質であり、ミクログリアのマーカーとしても用いられる。海馬 CA1 領域において、若齢マウスと比較して、老齢マウスでは Iba1 陽性ミクログリアの細胞数が増大し、形態も突起が短く細胞体が大い活性型へと変化していた。CD68 は貪食活性化したミクログリアのマーカーとして用いられ、主にリソソーム、エンドソームに局在する。老齢マウスの CA1 領域では、CD68 + Iba1 + ミクログリアが複数観察でき、貪食活性の亢進したミクログリアが多数存在していることが示された。CD68 シグナルの定量解析を行ったところ、老齢マウスでは Iba1 陽性ミクログリアに局在する CD68 Object 数、総シグナル強度が若齢マウスに比較して有意に増加しており、貪食活性が亢進している事が示された。

2024 年に細胞老化実験ガイドライン (Ogrodnik et al., Cell 2024 187(16):4150-4175.) で提唱された細胞老化マーカーの発現についても検討した。Lipofuscin は酸化したタンパク質や脂質により構成された凝集体であり、細胞老化とともにリソソ

ーム内に蓄積する不溶性の色素である。自家蛍光を発することから、ピンク色のシグナルとして観察できる。老齢マウスでは海馬神経細胞層に沿って、Lipofuscin シグナルが観察された。若齢マウスでは観察されなかった。核膜の裏打ち網目状構造ラミナの主要成分である LaminB1 は細胞老化とともにその発現が低下することが報告されている。若齢、老齢マウス双方において染色像が確認できたが、老齢マウスでは LaminB1 発現が低下している細胞核が多かった。サイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p21 も細胞老化マーカーの一つである。老齢マウスでは、p21 のシグナルが強く、発現細胞数が増大していた。p21 シグナルを定量化したところ（核内の p21 ドット数、核内の p21 面積%、核内の p21 平均シグナル強度）、神経細胞、ミクログリア共に、老齢動物において核内の p21 シグナルが増大していた。老齢神経細胞核内部の p21 シグナル陽性領域は蛍光強度が低く、小さな領域が多数存在しており、老齢ミクログリア核内部の p21 シグナル陽性領域は、蛍光強度が高く、大きいという特徴があった。細胞老化が進むとβ-gal 陽性となることが知られている。老齢動物では青色のβ-gal シグナルが観察された。以上の結果は老齢動物において、神経細胞とミクログリアの細胞老化度が亢進していることを示している。

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

(1) 老齢マウスのミクログリア形態

ミクログリアの数及び形態は、老齢マウス（24ヶ月齢）と若齢マウス（3ヶ月齢）では大きく異なっていた。老齢マウスのミクログリア数は、大脳皮質では約 85%、海馬では約 50%、と若齢マウスと比較して顕著に低下していた。ミクログリアの形態を Sholl analysis で解析した。老齢ミクログリアはアメボイド状であり、突起の複雑性が海馬では約 70%に、海馬では 40%程度にまで低下していた。

(2) 老齢マウスミクログリアの CSF-1R 拮抗薬 PLX3397 感受性

ミクログリアの PLX3397 感受性は、老齢及び若齢で大きく異なっていた。PLX3397 により、若齢ミクログリアは大脳皮質及び海馬ともに 95%以上が除去された。老齢ミクログリアは、大脳皮質で約 75%、海馬では約 50%が除去されたに過ぎなかった。

老齢マウスでは、ミクログリアの数、形態及び CSF-1R 拮抗薬感受性が大きく低下しており、これらは、シナプス、神経細胞さらに周辺細胞機能の機能低下に寄与している可能性が示唆された。また脳部位による差異も認められ、脳部位特異的な機能低下との関連性が示唆された。今後は、老

齢マウスにおいてミクログリアのリセット（除去/自己増殖）、移植による置換が可能であるか否かを確認し、老齢ミクログリアによる悪影響を最小化できるか否か、またそのメカニズムの解析を行う。

自然老化マウスの提供

研究期間中に実施した 4 回の病原微生物検査では、全検査項目で陰性を確認し、飼育環境が高い清浄度で維持されていることが示された。また、3 コホートの老齢マウスについて、搬出時（23ヶ月齢）における生存率は 80%前後であった。さらに、いずれのコホートにおいても数個体に軽度の腹部膨満や被毛の脱落、痂皮形成などが認められた。いずれも加齢に伴う軽度の病変であり、重篤な異常は認められなかった。マウスでは生存曲線が老化の指標の一つとされている。研究で使用した 3 コホートの生存曲線は、当センターが保有する基礎データと概ね合致しており、ロット差による大きな影響は認められなかった。また、病原微生物検査が陰性であったことから、本研究で用いたマウスは良好な SPF 環境下で維持されており、感染症による影響を受けていないことが確認された。これにより、観察された病変は主として加齢に起因するものであると考えられる。以上の結果から、本研究で作出・維持した老化マウスは、安定した条件下で飼育された標準的な老化モデルとして妥当であり、本研究における基盤的生物資源として有用であると考えられる。

D. 結論

化学物質によるゲノム毒性検出法の開発

1. 化学物質による体細胞突然変異検出法の開発

前年度までのプロトコルの改良に加え、本年度のライブラリ作製試薬の検討・変更によって、より DNA の損失を抑え、少量 DNA から ECS 解析ライブラリを作製するプロトコルを作成した。本課題でモデル細胞とする老齢神経細胞・ミクログリアについて、細胞分取後、細胞を集積・DNA を抽出する条件について検討し、同一サンプルから ECS 解析とメチル化解析を行うために十分な量の DNA が抽出できるプロトコルを確立した。それぞれのサンプルから ecNGS 解析用のライブラリを作製した。実際に老齢、若齢神経細胞サンプルの ecNGS 解析を行ったが、老齢サンプルにおける変異頻度上昇を検出するにはさらなるサンプル数が必要であることが示唆された。すなわち、老化細胞においては、N=3 で有意差がつくほどの劇的な体細胞突然変異は見られないことがわかったが、例数をあげることで有意差がつく微細な変異が起こっている可能性が示唆された。

2. 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

ナノポアシーケンサーを用いたメチル化解析法を用いて、老齢、若齢マウス神経細胞、ミクログリアのグローバルメチル化レベルを簡便迅速に解析することができた。老齢／若齢間のグローバルメチル化レベルでは神経細胞、ミクログリアとも大きな差がなかった。しかし、神経細胞／ミクログリア間では老齢、若齢、ともにミクログリアのメチル化が低い傾向を見いだした。

3. 転写に関連した突然変異生成の解析

ROS により S 期進行を抑制した条件下においても、DOX 添加による転写誘導により gpt 変異体頻度が上昇することを明らかにした。この結果は、DNA 複製の寄与が低下した条件下でも、転写誘導に関連した突然変異生成が生じ得ることを示唆している。一方、アルキル化剤 ENU を処理した条件では、ENU による gpt 変異体頻度の上昇は認められたものの、DOX 添加による転写誘導が ENU 誘発変異体頻度を明確に増強する傾向は認められなかった。したがって、今回の ENU 処理条件では、ENU 誘発突然変異に対する転写誘導の寄与は限定的である可能性が示された。以上より、CHO/TAM 解析系は、細胞分裂抑制条件下における転写関連突然変異生成を解析するための有用な実験系であると考えられた。今後は TAM の検出条件およびその機構をより詳細に明らかにする。

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

老齢神経細胞と老齢ミクログリアにおいて、細胞老化度等の脆弱性が亢進している可能性が示された。今後得られる scRNAseq データと共に、体細胞変異、エピジェネティクス異常と関連があるかどうかについても検討し統合することにより、的確なゲノム毒性評価系を確立する予定である。

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

老齢ミクログリアは数・形態・機能が大きく低下していた。また、老齢ミクログリア独自の置換法開発も必要である。

自然老化マウスの提供

次年度の研究実施に向け、複数コホートのマウスの飼育を継続する。また、定期的な病原微生物検査や健康観察も引き続き実施し、清浄環境の維持、並びに個体の健康状態の適切な管理に務める。

来年度への展望

老齢/若齢マウスの神経細胞、ミクログリアにお

いて、細胞老化等の細胞脆弱性マーカーが検出され、ミクログリアの体細胞突然変異が増加傾向を示したが、N=3 で有意な差がつくほどの大きな影響はないことが示された。老齢動物における細胞老化等、細胞脆弱性とゲノム脆弱性との関連については定量性が得られる特徴量を見いだしてまとめることを目的として次年度取り組む。中間評価ヒアリングでは、化学物質影響の評価にシフトすることを推奨された。当班では今年度までに、ゲノム脆弱性（体細胞突然変異、エピジェネティクス変異）の検出系を確立した。そこで、R8 には神経細胞系細胞株を採用し、増殖期、静止期における化学物質影響評価を行うこととした。陽性/陰性対象化学物質、PFOS 等の化学物質選択については、OECD ガイドラインのうち、哺乳類動物細胞を用いた in vitro 評価系で指定されている化学物質を選択する予定である。

4. 健康危険情報 特になし。

5. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi K, Quan A, Shigemoto-Mogami Y, Zhang B, Ohwada T, Abe I, Awakawa T, Sato K*. Search for Inhibitors against Inflammatory Responses of Microglia in a Meroterpenoid Library Constructed by Synthetic-Biological Manipulation of Biosynthetic Pathways. ACS Omega. Cite this: ACS Omega. 2026 Mar 24;11(13):20547-20558. doi: 10.1021/acsomega.5c12080. eCollection 2026 Apr 7. (*: corresponding author)
2. Shigemoto-Mogami Y, Nakayama-Kitamura K, Sato K*. Search for marker proteins to assess blood-brain barrier development. Front Neuroanat. 2026 Feb 24;20:1717532. doi: 10.3389/fnana.2026.1717532. eCollection 2026. PMID: 41816640
3. 佐藤 薫*, 高橋祐次, 鈴木郁郎. 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. 2025;145(6):501-505. doi: 10.1248/yakushi.24-00165-
4. Mishima M, Izawa K, Tsuda M, Higuchi Y, Uehara S, Suemizu H, Sugiyama KI*. Development of a DNA damage assay system using stable human hepatocytes Genes and Environment 48:3 (2026)
5. Sugiyama KI, Furuhashi A, Horibata K, Tsuda M, Izawa K, Tsuji G, Demizu Y, Matsushita K, Toyoda T, Hirabayashi Y, Saito Y, Honma M. Assessment of mutagenic potential of puberulic acid contaminated in red yeast rice (beni-koji) health food supplements. Mutagenesis. 41:110-118. (2026)
6. Matsumura, S., Hosoi, S., Hirose, T., Otsubo, Y., Saito, K., Miyazawa, M., Kawade, A., Hakura, A., Kakiuchi, D., Asakura, S., Koyama, N., Okada, Y., Chikura, S., Kimoto, T., Masumura, K., Suzuki, T. and Sugiyama,

- K*: Whole genome mutagenicity evaluation using Hawk-Seq™ demonstrates high interlaboratory reproducibility and concordance with the transgenic rodent gene mutation assay, *Genes and Environ.* 47, 13 (2025). <https://doi.org/10.1186/s41021-025-00336-w>
7. Yauk CL, Lynch AM, Dobrovolsky VN, Schuler M, Smith-Roe SL, Fitzgerald D, Higgins J, Honarvar N, Le Curieux F, Matsumura S, Minocherhomji S, Recio L, Salk JJ, Sugiyama KI, Suzuki T, Wills JW, Marchetti F. Application of error-corrected sequencing technologies for in vivo regulatory mutagenicity assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2026, 164:105985.
 8. Honda H, Suzuki T, Kitajima M, Kondo NI, Miyata K, Utsumi S, Yamada M. The new era shaped by environmental genome monitoring - symposium of the Japanese environmental mutagen and genome society (JEMS), 2024. *Genes Environ.* 2025, 47: 6.
 9. 鈴木孝昌*. Error-corrected next generation sequencing (ecNGS) の現状. 毒性質問箱. 2025;27:50-55
 10. Matsumoto M, Natsume M, Iso T, Umano T, Murata Y, Masumura K, Horibata K, Sugiyama KI*. Increased mutagenicity in the liver of MutaMouse females following oral treatment with commercial-grade toluene diisocyanate. *Genes Environ.* 2025;47:12.
 11. Shimozono K, Kim YJ, Hata T, Nan H, Saito K, Mori Y, Ueno Y, Isono F, Iwasaki M, Koizumi S, Ohtsuka T, Takiyama Y. (2025) 4-Phenylbutyric acid improves gait ability of UBAP1-related spastic paraplegia mouse model: Therapeutic potential of SPG80. *Int J Mol Sci.* Oct 8;26(19):9779. doi: 10.3390/ijms26199779.
 12. Ono Y, Tanaka K, Sato E, Ito M, Zhang D, Honda M, Ogawa T, Tagaya H, Fukuda T, Shinozaki Y, Kato K, Koizumi S, Yoshino O. (2025) Activated eosinophil plays a role in promoting fibrosis in endometriotic lesion. *Sci Rep.* Jul 31;15(1):28015. doi: 10.1038/s41598-025-13855-x.
 13. Kubota Y, Shigetomi E, Parajuli B and *Koizumi S. (2025) Astrocytes: Crucial signal transducers that convert norepinephrine inputs to ATP signaling in the brain. *Purinergic Signalling.* Aug 19. doi: 10.1007/s11302-025-10109-3s.
 14. Parajuli B, Doi H, Shigetomi E, Suzuki H, Saito K, *Sawada K, *Koizumi S. (2025) Development of a label-free Ca²⁺ image sensor to visualize extracellular Ca²⁺ dynamics in the biological samples. *Biosensors and Bioelectronics (IF=10.5)*, June27, 287, 117729. doi: 10.1016/j.bios.2025.117729
 15. Shimozono K, Kim YJ, Hata T, Nan H, Saito K, Mori Y, Ueno Y, Isono F, Iwasaki M, Koizumi S*, Ohtsuka T, Takiyama Y. (2025) 4-Phenylbutyric acid improves gait ability of UBAP1-related spastic paraplegia mouse model: Therapeutic potential of SPG80. *Int J Mol Sci.* Oct 8;26(19):9779. doi: 10.3390/ijms26199779.
 16. Ono Y, Tanaka K, Sato E, Ito M, Zhang D, Honda M, Ogawa T, Tagaya H, Fukuda T, Shinozaki Y, Kato K, Koizumi S*, Yoshino O. (2025) Activated eosinophil plays a role in promoting fibrosis in endometriotic lesion. *Sci Rep.* Jul 31;15(1):28015. doi: 10.1038/s41598-025-13855-x.
 17. Shuichi Yanai. Cooperation between behavioral science and gerontology to better understand and attack cognitive decline in an aging world. *Behavioral Science Research*, 63, 123-134. (2025). doi 無し
 18. Shipan Fan, Carina Ramallo-Guevara, Monika Frenzel, Shuichi Yanai, Sataro Goto, Michiru D. Sugawa, Norbert A. Dencher, Ansgar Poetsch. Not aging but calorie restriction strongly affects protein oxidation in heart and brain mitochondria. *Aging Cell*, 25, e70339 (2025). <https://doi.org/10.1111/accel.70339>
- ## 2. 学会発表
1. Takahashi K, Quan Z, Shigemoto-Mogami Y, Zhang B, Ohwada T, Abe I, Awakawa T, Sato K*. ミクログリア活性化抑制化合物の探索—天然物化合物から合成生物学的に創製したメロテルペノイドライブラリーの活用. 日本薬学会第 146 年会, 2026.3. 国内, 口頭.
 2. 最上(重本)由香里, 北村(中山)貴美子, 佐藤 薫*. 生後ラット大脳皮質微小血管血液脳関門 (Blood-brain barrier: BBB) 発達と血管周囲ミクログリア・アストロサイトの立体配置変動、BBB タンパク質発現変動の関連-BBB-生体模倣システム (microphysiological system: MPS) の品質管理項目の抽出-日本薬学会第 146 年会, 2026.3. 国内, ポスター.
 3. Sato K*. Mindset for the implementation of Microphysiological Systems (MPSs) in the drug development process. 第 25 回日本再生医療学会総会シンポジウム 座長・シンポジスト「生体模倣システム (MPS) アップデート ～繋ぐ～」 2026.3. 国内, シンポジウム.
 4. Shigemoto-Mogami Y, Takahashi K, Suzuki T, Izawa K, Masayuki M, Yanai S, Horibata K, Koizumi S, Sugiyama K, Sato K*. Analysis of genomic changes and phenotypic alterations associated with cellular senescence in neurons and microglia. 第 99 回日本薬理学会年会. 2026.3. 国内, ポスター.
 5. Shigemoto-Mogami Y, Takahashi K, Nakayama-Kitamura K, Suga K, Saito H, Sato K*. Application potential of magnetic resonance imaging (MRI) in preclinical seizure risk evaluation. 第 17 回日本安全性薬理研究会学術年会. 2026.2. 国内, ポスター.
 6. Shigemoto-Mogami Y, Nakamura-Kitamura K, Sato K*. The temporal expression patterns of brain microvascular endothelial cells' proteins until blood-brain barrier (BBB) maturation-an attempt to make a recipe to determine the BBB developmental stage. MPS 実用化推進協議会第 3 回学術シンポジウム. 2026.1. 国内, ポスター.
 7. Nakayama-Kitamura K, Shigemoto-Mogami Y, Sato K*. Blood-brain barrier (BBB) permeability test protocols for humanized BBB -microphysiological systems (MPS) incorporating human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived BBB cells should be optimized for the substrate modalities. MPS 実用化推進協議会第 3 回学術シンポジウム. 2026.1. 国内, ポスター.
 8. Nakayama-Kitamura K, Shigemoto-Mogami Y, Sato

- K*. The performance characteristics of the commercially available blood brain barrier (BBB)-model installing human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived BBB cells. CBI 学会 2025 年大会. 2025.10. 国内, ポスター.
9. 最上 (重本) 由香里, 北村 (中山) 貴美子, 佐藤 薫*. 生後ラット blood brain barrier (BBB) 発達に伴う脳微小血管周囲グリア細胞立体配置および BBB タンパク質発現変化に関する検討- BBB-生体模倣システム (MPS) の品質向上を目指して-. 第 153 回日本薬理学会関東部会. 2025.10. 国内, ポスター.
 10. Shigemoto-Mogami Y, Kitamura K, Hoshikawa K, Sato K*. The role of microglia on the functional maturation of the blood brain barrier (BBB) in the rat postnatal cerebral cortex (CC). 第 68 回日本神経学会大会. 2025.9. 国内, ポスター.
 11. 山崎大樹, 木村啓志, 足利太可雄, 堀武志, 佐藤 薫, 最上由香里, 石田誠一. 生体模倣システム (MPS) の行政的利用の推進戦略と評価法構築における考慮事項. 第 2 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会. 2025.9. 国内, ポスター.
 12. Takahashi K, Quan Z, Awakawa T, Shigemoto-Mogami Y, Ohwada T, Abe I, Sato K*. Search for compounds with inhibitory effects on microglial activation in a small-molecule library constructed by synthetic biology. 第 48 回日本神経科学大会. 2025.7. 国内, ポスター.
 13. 最上 (重本) 由香里, 北村 (中山) 貴美子, 佐藤 薫*. ヒト型血液脳関門 (BBB) -MPS の BBB 成熟段階を判定するための品質管理 (Quality control: QC) 項目の探索—脳微小血管周囲のグリア細胞立体配置および BBB 機能タンパク質発現に関する動物モデルでの検討-. 第 32 回 HAB 研究会. 2025.5. 国内, ポスター.
 14. Sato K*, Kawabata K, Nakatani N, Matsusaki M, Ito Y. Progress in the product implementation of “BBB-NET”, the receptor-mediated transport assay platform incorporating humanized 3 dimensional (3D) blood brain barrier (BBB) network microphysiological system (MPS). MPS World Summit 2025. 2025.6. 国外, ポスター.
 15. 最上 (重本) 由香里* ミクログリアの新しい生理機能の発掘を目指して ミニ口演 第68回日本神経化学大会 (愛知 2025. 9)
 16. 伊澤和輝、諸角涼介、津田雅貴、杉山圭一、ecNGS methods for detecting low-frequency somatic mutations and example of practical application、IIBMP2025、2025 年 9 月 (名古屋)
 17. 伊澤和輝、津田雅貴、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、日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会、2025 年 11 月 (静岡)
 18. 鈴木孝昌, 杉山圭一, 降旗千恵 Robustness of the four maker genes (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) for predicting genotoxic hepatocarcinogens. 第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 9 26, 金沢)
 19. 鈴木孝昌, 三島雅之, 笠原杏奈, 最上由香里, 高橋華奈子, 佐藤 薫, 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. 第 53 回日本環境変異原ゲノム学会年次大会 (2025.11.22, 静岡)
 20. 降旗千恵, 杉山圭一. 鈴木孝昌*. 遺伝毒性肝発がん物質の予測に有用な 4 マーカー遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) 第 84 回日本癌学会学術総会 (2025.9)
 21. 増村健一, 安東朋子, 堀端克良, 石井雄二, 杉山圭一*: マウスを用いたアクリルアミドの in vivo 変異原性と次世代に誘発される生殖細胞系列突然変異の解析. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7)
 22. 吉田愛海, 江田侑未, 杉山圭一, 堀端克良*: 遺伝情報発現に付随する突然変異誘発と細胞周期の影響. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
 23. 江田侑未, 佐々木沙耶, 吉田愛海, 杉山圭一, 堀端克良*: クロマチン画分上の DNA 損傷応答解析を利用した遺伝毒性反応の検出. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
 24. 松本真理子, 磯貴子, 馬野高昭, 大道友香, 広瀬望, 若山美智子, 増村健一, 堀端克良, 杉山圭一*: グリシジルメタクリレート経口投与による雄 MutaMouse における in vivo 変異原性の検討. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
 25. 羽倉昌志, 須井哉, 川上久美子, 加藤雅之, 皿田巳子, 杉山圭一, 堀端克良, 峯川和之, 山本美佳, 山田雅巳: TA100 株の感受性の違いについての一考察 (BMS pilot study). 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
 26. グルーズピーター, 山田雅巳, 堀端克良, 杉山圭一*: AlkB と触媒活性を欠損した DNA ポリメラーゼ IV が Ames 試験で hisG46 標的の変異誘発に及ぼす影響. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
 27. 柳井修一*・石神昭人. 9 ヶ月齢までの C57BL/6 マウスにおける成長曲線と血液生化学の亜系統差と性差. 第 72 回日本実験動物学会総会, 名古屋国際展示場ポートメッセなごや, 2025/5/21-23
 28. 井上律子・柳井修一*. 老化マウスの歩行とコエンザイム Q10 補充による介入. 第 48 回日本基礎老化学会大会. 幕張メッセ, 2025/6/27-29
 29. 柳井修一*・遠藤昌吾. 老齢マウスにおける認知機能と身体機能の性差. 第 48 回日本基礎老化学会大会. 幕張メッセ, 2025/6/27-29
 30. Shuichi Yanai*, Tetsuro Tago, Jun Toyohara, & Shogo Endo. Phosphodiesterase 3 inhibition by cilostazol reverses spatial memory impairment associated with reduced neuroinflammation and increased cerebral glucose uptake in aged mice. 第

48 回日本神経科学大会，朱鷺メッセ，
2025/7/24-27

31. 柳井修一*・遠藤昌吾．C57BL/6J マウスの行動学的表現型に基づく老化の様相．第 59 回日本実験動物技術者協会総会．米子市文化ホール・米子コンベンションセンター，2025/10/23-25
32. 柳井修一*．行動から探る老化のサイン－網羅的解析による表現型の定量－．第 98 回日本生化学会大会，京都国際会館，2025/11/3-5
33. 大友竣生・目時美和子・柳井修一・福井浩二．アデニンによる慢性腎臓病モデルでの全身性炎症と複合抗酸化物質によるその抑制効果の検討．第 36 回腎とフリーラジカル研究会，川崎医

科大学総合医療センター，2025/11/15

34. 柳井修一*．年次大会とウィンターカンファレンスから振り返る日本行動科学学会 65 年の歩み．日本行動科学学会第 41 回ウィンターカンファレンス．軽井沢芸術倶楽部，2026/2/9-11

6. 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。

化学物質による体細胞突然変異検出法の開発

研究分担者 伊澤 和輝、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

研究要旨

近年、細胞分裂が終了した体細胞に化学物質等が DNA 突然変異 (Knobel et al., 2022) やメチル化等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。しかし、これまでに体細胞突然変異やエピジェネティクス異常の評価系は確立されておらず、生体影響についても十分に検討されていない。そこで、これらゲノム毒性の検出系、ゲノム毒性リスクの *in vitro* 評価系を確立することを 3 年間の目的とする。検出系確立のためのモデル細胞として、上記メカニズムによるゲノム変異蓄積が予想される老齢（自然老化）マウスから採材した脳神経細胞（分化後に分裂しない）、ミクログリア（顕著に分裂速度が遅い）、コントロール細胞として若齢マウスから採材した両細胞を採用した。ゲノム毒性は細胞老化度に関連していることも示唆されているため (Miller et al., 2022) 検証する。

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) 解析の手法が開発され、世界的に注目されている。ecNGS 解析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 解析を適用することで、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 解析は細胞や 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。

本年度においては、別班から提供された若齢・老齢マウスの神経細胞およびミクログリア細胞から十分量の DNA を回収する条件の確立を目指した。また回収された DNA サンプルから ecNGS 解析用のライブラリを作製し、ecNGS 解析を行った。

まず若齢・老齢マウスの神経細胞およびミクログリア細胞を分取したサンプルについて、細胞を集積し DNA 抽出を行う条件の検討、および ecNGS 解析を行い解析にかかるパラメーターを最適化した。細胞集積・DNA 抽出条件の検討の結果、若齢神経細胞において 200ng~600ng、老齢神経細胞では 160ng~600ng、若齢ミクログリア細胞では 400ng~600ng、老齢ミクログリア細胞では 500ng~900ng 程度の DNA を抽出することができる条件を確立した。神経細胞およびミクログリア細胞由来の DNA に関し、十分量の DNA が存在するサンプルについては同一サンプルからメチル化解析も実施することが可能であると考えられたため、100ng 程度を別班に分与した。加えて、前年度までに検討されていたプロトコルをさらに改良したプロトコルを用いて ecNGS 解析用のライブラリを作製し、ecNGS 解析を行った。解析の結果、若齢マウス神経細胞において平均 3.7×10^{-8} 、老齢マウス神経細胞において平均 2.6×10^{-8} と変異頻度が計算された。また、若齢マウスミクログリア細胞において平均 7.9×10^{-8} 、老齢マウスミクログリア細胞において平均 11.0×10^{-8} と変異頻度が計算された。ミクログリア細胞において老齢個体において変異頻度の上昇傾向が見られたものの、神経細胞とミクログリア細胞の何れにおいても、統計的に差があるとはいえなかった。先行研究においては加齢によりヒトの神経細胞で変異頻度が上昇することが報告されている (Ganz et al., 2024)。マウス脳においても変異頻度が上昇することが報告されているが、個体間でのバラつきが大きい (Zhang et al., 2011)、本研究においても細胞老化に関連した変異を検出するためには、より多くのサンプル数が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、細胞分裂が終了した体細胞に化学物質等が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。しかし、これまでに体細胞突然変異やエピジェネティクス異常の評価系は確立されておらず、これらの生体影響についても十分に検討されていない。そこで、これらのゲノム毒性の検出系、ゲノム毒性リスクの *in vitro* 評価系を確立することが全体計画の目的である。検出系確立のためのモデル細胞として、上記メカニズムによるゲノム変異蓄積が予想される、老齢（自然老化）マウスから採材した脳神経細胞（ほとんどの細胞が分化後に分裂しない）、ミクログリア（細胞分裂はおこすものの、他臓器よりも顕著に分裂速度が遅い）、コントロール細胞として、若齢マウスから採材した両細胞を採用した。また、ゲノム毒性は細胞老化度に関連している (Miller et al., 2022) という知見もあるため、これを検証する。

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) 解析の手法が開発され、世界的に注目されている。ecNGS解析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 解析を適用することで、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 解析は細胞や 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。本年度においては、別班から提供された若齢・老齢マウスの神経細胞およびミクログリア細胞から十分量の DNA を回収する条件の確立を目指した。また回収された DNA サンプルから ecNGS 解析用のライブラリを作製し、ecNGS 解析を行った。

B. 研究方法

① DNA抽出条件の検討

Miltenyi Biotec 社の MACS により分取されたマウスの神経細胞・ミクログリア細胞サンプルについて、細胞回収時の遠心速度などの条件を複数用意し、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Netherlands) を用いて DNA を抽出した。

② DNA断片分子確保プロトコル最適化・ライブラリ作製

前年度行ったライブラリ作製プロトコルの改良に加え、本年度は酵素による断片化とニック処理の後工程を変更した。別課題において、既存プロトコルと比較して、よりステップが少なく 1 チューブで反応させることができる NEBNext® Ultra™ II DNA PCR-free Library Prep Kit for Illumina® のキットを用いる事によりさらに DNA の損失を抑えながら ecNGS 解析用のライブラリを作製できることが明らかとなっていた。そこで、本研究においても PECC-Seq 法におけるライブラリ作製プロトコルについてこれを採用した。

ゲノム DNA 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 Nuclease P1 (New England Biolabs, 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 NEBNext® Ultra™ II DNA PCR-free Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs, 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。シーケンスには国立医薬品食品衛生研究所設置の NextSeq2000 (Illumina, Inc., USA) を用いた。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、公開されているマウスのゲノム配列 (GRCm39) 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。ECS 解析手法としては PECC-Seq を用いた。

C. 研究結果

ecNGS法を用いたゲノム毒性評価系の開発

① DNA抽出条件および分取細胞数と抽出DNA濃度

DNA抽出条件の検討の結果、1000Gの遠心速度で5分間遠心をした場合に解析十分量 (>100ng) のDNAが回収可能であることが明らかとなった。この条件において分取された細胞数と抽出DNA濃度について表1にまとめた。

ECS解析とメチル化解析を同一個体から得られたサンプルを用いて行うため、十分なDNA量が見込めるサンプル（下記灰色行）を採用した。またこれらのサンプルについてはメチル化解析班に分与した。

②ライブラリ濃度

上記サンプルについて100 ng～300 ng程度のDNAを用いて改良したプロトコルによりライブラリを作製し

た。それぞれのサンプルから作製されたライブラリの濃度を表2に示す。

一部のサンプル(下記灰色行)において得られたライブラリ濃度が一般的な NGS 受託解析の濃度である 5nM を下回ったが、他のサンプルでは 5nM 以上のライブラリが得られた。

② ECS解析結果

若齢神経細胞サンプル No. 13、14、15、および老齢神経細胞サンプル No. 08、13、14 について ECS 解析を行った。解析の結果、若齢神経細胞において平均 3.7×10^{-8} 、老齢神経細胞において平均 2.6×10^{-8} と変異頻度が計算された(図 1)。統計解析の結果、若齢と老齢サンプル間で変異頻度に差があるとはいえなかった。

若齢ミクログリア細胞サンプル No. 4、5、10 および老齢ミクログリア細胞サンプル No. 04、05、11 について ECS 解析を行った。解析の結果、若齢ミクログリア細胞において平均 7.9×10^{-8} 、老齢神経細胞において平均 11.0×10^{-8} と変異頻度が計算された(図 2)。老齢サンプルにおいて、変異頻度の上昇傾向が見られたものの、統計解析の結果、若齢と老齢サンプル間で変異頻度に差があるとはいえなかった。

D. 考察

ecNGS法を用いたゲノム毒性評価系の開発

サンプル間の比較においては、神経細胞サンプルよりもミクログリアサンプルの方が回収できるDNA量が多い傾向が示唆された。これは神経細胞がほぼ分裂しない一方で、ミクログリアは速度が非常に遅いものの、分裂能があることに由来すると考えられた。これまでの採材において、マウス各個体から 1×10^5 以上の神経細胞およびミクログリアが回収できており、これらのサンプルから ecNGS 解析およびメチル化解析に十分なDNA量が回収可能であることが明らかとなった。

若齢・老齢の神経・ミクログリア細胞における変異頻度の比較について、本年度はそれぞれ3サンプルずつの比較を行った。その結果、それぞれの老齢個体における変異頻度の上昇を検出することはできなかった。先行研究として、脳における変異頻度を遺伝子改変マウスを用いて算出した報告があるが(Zhang et al., *Annu Rev Genet.* 2018, Dollé et al., *Nat Genet.* 1997)、加齢に伴う変異頻度上昇は微量かつ個体間のバラつきが大きいことが示されている。そのため老齢個体における変異頻度上昇を検出するには、さらに例数を上げて統計解析を行う必要があることが示唆された。一方で、遺伝子改変マウスよりも精緻に変異頻度を検出可能なECS解析を用いていることから、従来よりも少ない使用動物数での議論が可能であることが期待される。

E. 結論

ゲノム毒性検出法の開発

前年度までのプロトコルの改良に加え、本年度のラ

イブラリ作製試薬の検討・変更によって、よりDNAの損失を抑え、少量DNAからECS解析ライブラリを作製するプロトコルを作成した。本課題でモデル細胞とする老齢神経細胞・ミクログリアについて、細胞分取後、細胞を集積・DNAを抽出する条件について検討し、同一サンプルからECS解析とメチル化解析を行うために十分な量のDNAが抽出できるプロトコルを確立した。それぞれのサンプルから ecNGS 解析用のライブラリを作製した。実際に老齢、若齢神経細胞サンプルの ecNGS 解析を行ったが、老齢サンプルにおける変異頻度上昇を検出するにはさらなるサンプル数が必要であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mishima M, Izawa K, Tsuda M, Higuchi Y, Uehara S, Suemizu H, Sugiyama KI. Development of a DNA damage assay system using stable human hepatocytes Genes and Environment 48:3 (2026)
2. Sugiyama KI, Furuhashi A, Horibata K, Tsuda M, Izawa K, Tsuji G, Demizu Y, Matsushita K, Toyoda T, Hirabayashi Y, Saito Y, Honma M. Assessment of mutagenic potential of puberulic acid contaminated in red yeast rice (beni-koji) health food supplements. *Mutagenesis*. 41:110-118. (2026)

2. 学会発表

- 1 伊澤和輝、諸角涼介、津田雅貴、杉山圭一、ecNGS methods for detecting low-frequency somatic mutations and example of practical application、IIBMP2025、2025 年 9 月(名古屋)
- 2 伊澤和輝、津田雅貴、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、日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会、2025 年 11 月(静岡)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

表 1. 分取細胞数と抽出 DNA 濃度

サンプル名	細胞数($\times 10^5$)	DNA量 (ng)
若齢神経07	3.1	194
若齢神経08	2.9	472
若齢神経09	1.6	363
若齢神経13	5.6	512
若齢神経14	4.5	652
若齢神経15	4.1	524
若齢ミクログリア04	2.7	716
若齢ミクログリア05	3.7	840
若齢ミクログリア10	3.2	628
若齢ミクログリア11	3.0	448
若齢ミクログリア12	3.8	536
老齢神経07	4.1	313
老齢神経08	3.3	582
老齢神経09	7.4	167
老齢神経13	2.9	396
老齢神経14	4.9	428
老齢神経15	3.0	238
老齢ミクログリア04	3.4	816
老齢ミクログリア05	4.0	604
老齢ミクログリア10	3.0	516
老齢ミクログリア11	3.4	912
老齢ミクログリア12	3.7	496

表2. 各サンプルから作製されたライブラリ濃度

サンプル名	ライブラリ濃度 (nM)
若齢神経13	2.7
若齢神経14	4.7
若齢神経15	6.4
若齢ミクログリア04	3.4
若齢ミクログリア05	5.8
若齢ミクログリア10	5.0
老齢神経08	9.2
老齢神経13	10.2
老齢神経14	6.4
老齢ミクログリア04	8.9
老齢ミクログリア05	6.9
老齢ミクログリア11	7.3

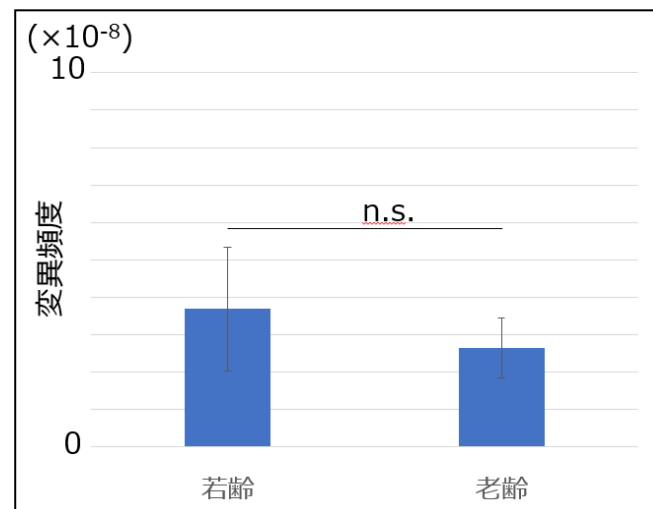


図 1. 神経細胞における変異頻度

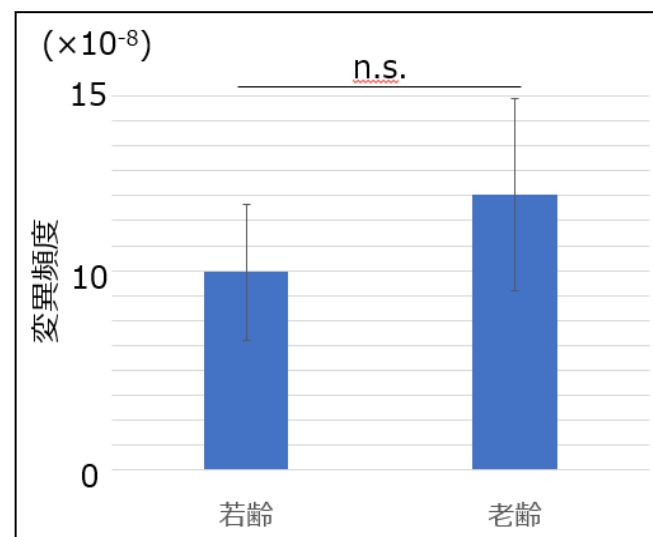


図 2. ミクログリア細胞における変異頻度

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

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

研究要旨

既に確立したナノポアシーケンサーを用いたDNAグローバルメチル化レベルの簡便迅速な解析手法を応用し、神経系細胞でのメチル化の解析を行った。老齢／若齢間のDNAグローバルメチル化レベルでは神経細胞、ミクログリアとも大きな差がなかった。神経細胞／ミクログリア間では老齢、若齢ともにミクログリアでの低メチル化傾向を見いだした。さらに、肝臓と腎臓においても加齢によるメチル化の変化を調べたが、大きな変化は見られなかった。今後は、リストアップしたMouse epigenetic clock 遺伝子を含めた部位特異的なメチル化解析を行う予定である。

A. 研究目的

化学物質への曝露により引き起こされる、ゲノム不安定性などのゲノム異常を、DNA メチル化というエピジェネティックな観点から評価するため、ゲノムワイドにDNA グローバルメチル化を解析可能な新規開発手法を用いて、ナノポアシーケンサーによる *in vivo* 組織での定量的評価を行う。また、細胞老化とゲノム不安定性の関連性を評価するため、若齢及び老齢マウスにおける各組織細胞のメチル化レベルの変化を解析する。

B. 研究方法

ゲノムのエピジェネティクス異常検出法の開発

グローバルメチル化の評価に関しては、ナノポアシーケンサーを用いたメチル化解析法を用いた。本解析法は研究分担者が確立した手法であり簡便迅速という利点がある。本研究班では、5週令及び84週令のC57BL/6マウスの脳、肝臓、腎臓におけるDNAメチル化について検討した。

部位特異的なメチル化の検討に向けて、老化によりメチル化レベルの変化することが知られているEpigenetic clock遺伝子のマウスにおける報告を調べ、ゲノム上の位置をリストアップした。

C. 研究結果

ゲノムのエピジェネティクス異常検出法の開発

老齢および若齢マウスの神経細胞とミクログリアのDNAメチル化（5-methyl C及び5-hydroxymethyl C）レベルを調べた結果、CpGサイトのメチル化は50-60%であり、両者に大きな差は見られなかった（図4）。CpGサイトに限定しない場合にも同様の傾向が見られたが、

そのレベルは10%以下と低く、DNAのメチル化は主にCpGサイトで起きることが確認できた。また、神経細胞—ミクログリアの比較では、若齢、老齢ともに神経細胞に比べてミクログリアのメチル化レベルが低い傾向が見られた。考察のため、5週令及び84週令のC57BL/6マウスの脳、肝臓、腎臓におけるDNAメチル化も検討した。これらの臓器においても、週齢による明らかな差は認められなかった（図5）。従って、DNAメチル化に関しては特定部位について解析する必要があることがわかった。今後は、その有力な候補として、LINE-1配列やepigenetic clock遺伝子のメチル化レベルの解析を行う予定である。

この解析に向けて、マウスにおけるエピジェネティッククロック遺伝子に関する情報を調べ、それらをゲノム上の位置情報と共にリストアップしたのが表Xである。

D. 考察

ゲノムのエピジェネティクス異常検出法の開発

一般的に、老化によりゲノムDNAのメチル化レベルの変化が起きることが知られており、特定遺伝子のメチル化レベルは、epigenetic clockとして、細胞年齢の推定に利用できる。今後の解析に向けて、マウスにて報告されているepigenetic clock遺伝子を調べ、それらのマウスゲノム上での位置情報を取得した。

今回の検討では特定の遺伝子ではなくゲノム全体のグローバルなメチル化の変化を解析したため、大きな変化は検出できなかったと考えられる。ただし、神経細胞とミクログリアの間でメチル化レベルの差が見られたことは重要な新知見である。神経細胞とミクログリアの細胞起源が大きく異なる点や、各細胞の生理学的機能との関連が示唆される。特にミクログリアは脳神経系において、外部影響を最初に受ける細胞であるため、*in vitro*評価系に最適な細胞選択において考慮する

点となり得る。一方で、ゲノム不安定性のバイオマーカーとして、特定遺伝子のメチル化状態に注目するべきかもしれない。シークエンスデータのマッピングを行いゲノム上の位置情報を得たのちに、LINE-1やepigenetic clock遺伝子などの特定部位のメチル化の変化を検出したいと考えている。

E. 結論

ナノポアシーケンサーを用いたメチル化解析法を用いて、老齢、若齢マウス神経細胞、ミクログリアのグローバルメチル化レベルを簡便迅速に解析することができた。老齢／若齢間のグローバルメチル化レベルでは神経細胞、ミクログリアとも大きな差がなかった。しかし、神経細胞／ミクログリア間では老齢、若齢、ともにミクログリアのメチル化が低い傾向を見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Matsumura, S., Hosoi, S., Hirose, T., Otsubo, Y., Saito, K., Miyazawa, M., Kawade, A., Hakura, A., Kakiuchi, D., Asakura, S., Koyama, N., Okada, Y., Chikura, S., Kimoto, T., Masumura, K., Suzuki, T. and Sugiyama, K.: Whole genome mutagenicity evaluation using Hawk-Seq™ demonstrates high interlaboratory reproducibility and concordance with the transgenic rodent gene mutation assay, *Genes and Environ.* **47**, 13 (2025). <https://doi.org/10.1186/s41021-025-00336-w>
- 2 Yauk CL, Lynch AM, Dobrovolsky VN, Schuler M, Smith-Roe SL, Fitzgerald D, Higgins J, Honarvar N, Le Curieux F, Matsumura S, Minocherhomji S, Recio L, Salk JJ, Sugiyama KI, Suzuki T, Wills JW, Marchetti F. Application of error-corrected sequencing technologies for *in vivo* regulatory mutagenicity assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2026, 164:105985.
- 3 Honda H, Suzuki T, Kitajima M, Kondo NI, Miyata K, Utsumi S, Yamada M. The new era shaped by environmental genome monitoring - symposium of the Japanese environmental mutagen and genome society (JEMS), 2024. *Genes Environ.* 2025, 47: 6.
- 4 鈴木孝昌. Error-corrected next generation sequencing (ecNGS) の現状. 毒性質問箱. 2025;27:50-55

2. 学会発表

- 1 鈴木孝昌, 杉山圭一, 降旗千恵 Robustness of the four maker genes (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) for predicting genotoxic hepatocarcinogens. 第84回日本癌学会学術総会 (2025 9 26, 金沢)
- 2 鈴木孝昌, 三島雅之, 笠原杏奈, 最上由香里, 高橋華奈子, 佐藤 薫, 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. 第53回日本環境変異原ゲノム学会年次大会 (2025.11.22,

静岡)

- 3 降旗千恵, 杉山圭一, 鈴木孝昌. 遺伝毒性肝発がん物質の予測に有用な4マーカー遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) 第84回日本癌学会学術総会 (2025.9)

G. 知的所有権の取得状況

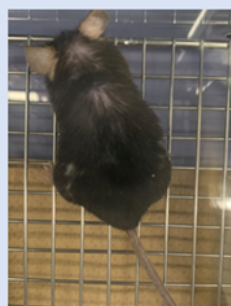
該当なし

若齢・老齢マウスを納入

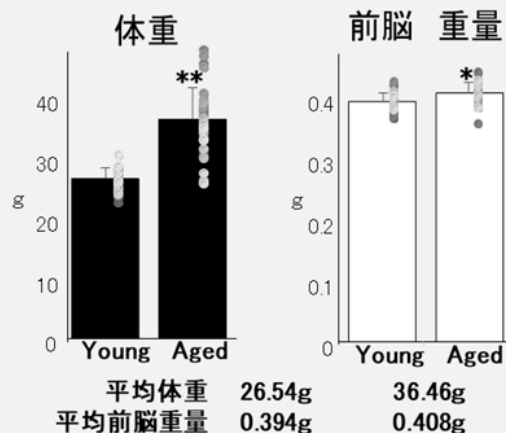
東京都健康長寿医療センター研究所 柳井先生より



C57BL/6J mice
3 months, ♂ (n = 37)



C57BL/6J mice
24 months, ♂ (n = 36)



脳組織分散と細胞単離手法の確立



自動組織分散装置 MACSシステム



FACS

ミルテニー社のMACSシステムにより、若齢・老齢マウスの前脳領域より神経細胞・ミクログリアの回収方法を確立した。
回収した神経細胞濃縮液の約8割がNeuN陽性の成熟神経細胞であった。
回収したミクログリアのほぼ8割がTMEM119陽性ミクログリアであった。

☆神経細胞 C57BL/Ncrを用いた検討
Biotin-細胞 若齢マウス 細胞数: 8.9×10^4 細胞、純度: 95.14 %
老齢マウス 細胞数: 5.7×10^4 細胞、純度: 96.19 %
Biotin- NeuN+ 細胞
若齢マウス 純度: 84.30 %、
老齢マウス 純度: 75.14 %
☆ミクログリア
CD45+ CD11b+ 細胞
若齢マウス 細胞数: 4.12×10^4 細胞、純度: 92.15 %
老齢マウス 細胞数: 3.02×10^4 細胞、純度: 88.02 %
CD45+ CD11b+ TMEM119+ 細胞
若齢マウス 純度: 85.78 %
老齢マウス 純度: 77.34 %

ゲノム毒性検出法

① 開発グループに提供

若齢マウス 13 (神経8, ミクログリア5)
老齢マウス 13 (神経8, ミクログリア5)

単離細胞を用いた、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検出

② シングルセル トランスクリプトーム解析

若齢マウス 18 (神経9, ミクログリア9)
老齢マウス 18 (神経9, ミクログリア9)
細胞(プール)を回収後、FLEX固定化し-80℃
→受託解析へ

単離細胞のシングルセルレベルでの
細胞性状解析

③ 細胞培養

若齢マウス 3
老齢マウス 3
細胞回収後、細胞ごとに至適条件下にて、
37℃培養

単離した神経細胞とミクログリアの培養条件の
整備と細胞性状変化解析

④ 免疫組織化学検討

若齢マウス 5
老齢マウス 4
PFA心灌流固定後、凍結切片を作成し
特異的抗体を用いて染色

生体レベルの神経細胞とミクログリアの加齢に
伴う細胞性状変化解析と老化指標の明確化

図1. 老齢動物搬入、ゲノム毒性検出法確立、
細胞老化指標の明確化までの実験の流れ

Methylation in neuron and microglia of young and old mouse

sample	Y-13 neuron	Y-14 neuron	Y-15 neuron	O-8 neuron	O-13 neuron	O-14 neuron	Y-4 microglia	Y-5 microglia	Y-10 microglia	O-4 microglia	O-5 microglia	O-11 microglia
total_reads_used	7393	266	7916	7669	10921	22085	24124	21449	27304	17066	22852	19935
C_total_unmod_calls	93269	3128	106216	112253	146070	282362	279824	274934	343018	193687	317519	214303
C_total_mod_calls(5mC)	204204	5710	257126	287214	358943	549128	388997	489436	544226	276591	559443	354827
C_total_mod_calls(5hmC)	18628	472	25120	37180	41892	70908	26653	32866	36700	19167	37889	25217
C_pass_frac_unmodified	0.295	0.336	0.273	0.257	0.267	0.313	0.402	0.345	0.371	0.396	0.347	0.361
C_pass_frac_modified_m (5mC)	0.646	0.646	0.662	0.658	0.656	0.609	0.559	0.614	0.589	0.565	0.612	0.597
C_pass_frac_modified_m (5hmC)	0.059	0.051	0.065	0.085	0.077	0.079	0.038	0.041	0.040	0.039	0.041	0.042
Total modification %	0.705	0.697	0.727	0.743	0.733	0.687	0.598	0.655	0.629	0.604	0.653	0.639
mean	0.709			0.721			0.627			0.632		

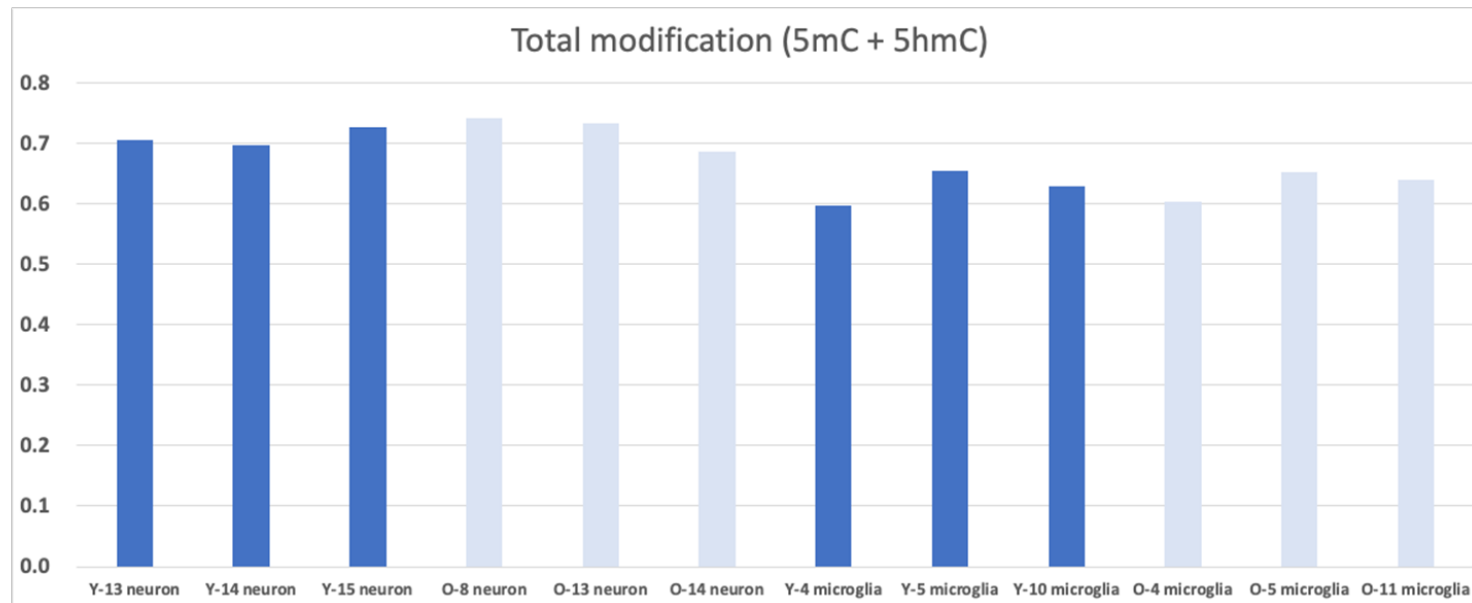


图4

Global methylation in brain, liver and kidney of young and old C57BL/6 mouse

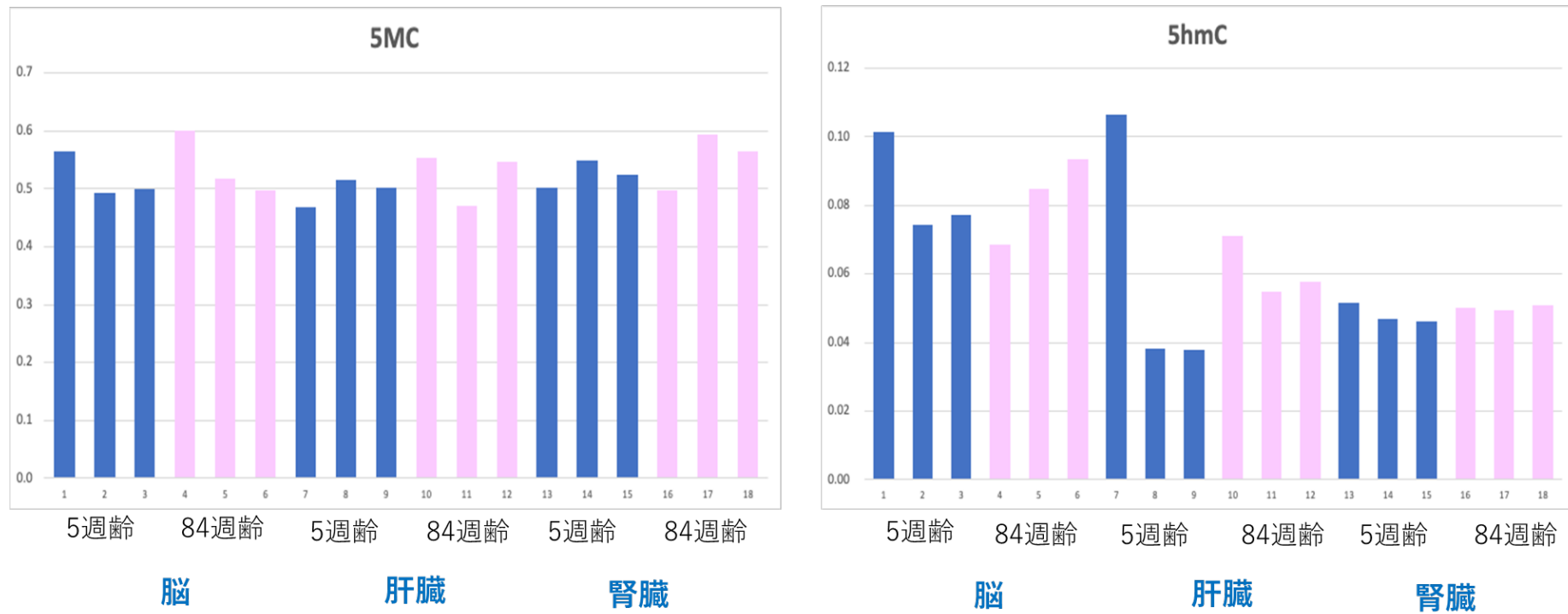


図5

表 マウスEpigenetic clock遺伝子とゲノム上の位置

ID	CpG Mouse Methylation Array	CHR	MAPINFO	Gene	R B6	R2 B6	R DBA	R2 DBA	Mean R2	Homologous location in human (GRCh37)	Homologous CpG location in human Methylation 450	R human	R2 human	p-value human	Significant (alpha = 0.01)	Category	Distance in bp	Intersection	Slope
1	cg42528232	5	105409216		-0.97	0.94	-0.98	0.96	0.95	-	-	-	-	-	-	-	-	1.08	-2.56
2	cg29748675	11	73324349	Aspa	-0.94	0.88	-0.99	0.97	0.93	17.3379534:3379655-1	cg02228185	-0.57	0.32	4.49E-57	Yes	HOM.	-	0.97	-1.17
3	cg30271979	11	119210883	Tbc1d16	-0.96	0.91	-0.96	0.93	0.92	-	-	-	-	-	-	-	-	1.56	-1.80
4	cg30271978	11	119210869	Tbc1d16	-0.96	0.92	-0.96	0.92	0.92	-	-	-	-	-	-	-	-	1.34	-1.72
5	cg36215530	19	20602346	Akh1a1	-0.97	0.94	-0.95	0.90	0.92	9.75567483:75567613-1	cg01812894	-0.56	0.32	1.60E-56	Yes	DIST.	958	1.56	-1.81
6	cg41908051	5	21373550	Fgl2	-0.95	0.90	-0.96	0.93	0.91	7.76828160:76828308-1	cg14752838	0.09	0.01	2.04E-02	No	DIST.	651	1.13	-1.48
7	cg47088623	9	92276475		-0.93	0.86	-0.98	0.97	0.91	-	-	-	-	-	-	-	-	1.56	-2.28
8	cg29601161	11	59283020	Wnt3a	-0.94	0.88	-0.97	0.94	0.91	1.228202533:228202658-1	cg21934230	-0.35	0.12	2.83E-20	Yes	HOM.	-	0.99	-1.55
9	cg31044702	12	103214639	Prima1	-0.93	0.87	-0.97	0.95	0.91	14.94215181:94215301-1	cg16244889	-0.04	0.00	2.58E-01	No	DIST.	3423	2.31	-2.53
10	cg29045777	10	118049337		-0.97	0.93	-0.93	0.87	0.90	12.68800166:68800280-1	cg11783364	-0.09	0.01	2.68E-02	No	DIST.	85	2.25	-2.40
11	cg31044701	12	103214578	Prima1	-0.94	0.88	-0.96	0.92	0.90	14.94215181:94215241-1	cg16244889	-0.04	0.00	2.58E-01	No	DIST.	3362	1.49	-1.85
12	cg46095458	8	105270995	Hsf4	0.94	0.89	0.95	0.90	0.89	16.67199792:67199917-1	cg04235075	0.25	0.06	1.43E-10	Yes	HOM.	-	-0.46	2.44
13	cg29372013	11	31713858		-0.95	0.89	-0.95	0.89	0.89	5.173098102:173098224-1	cg16488580	-0.18	0.03	2.83E-06	No	DIST.	593	1.47	-2.20
14	cg29601160	11	59283958	Wnt3a	-0.91	0.83	-0.98	0.96	0.89	1.228202592:228202736-1	cg21934230	-0.35	0.12	2.83E-20	Yes	HOM.	-	1.27	-1.37
15	cg29748676	11	73324412	Aspa	-0.91	0.83	-0.98	0.95	0.89	17.3379471:3379592-1	cg02228185	-0.57	0.32	4.49E-57	Yes	HOM.	-	1.21	-1.19
16	cg36153969	19	11050061	AW112010	-0.91	0.82	-0.98	0.96	0.89	-	-	-	-	-	-	-	-	1.07	-1.60
17	cg30147805	11	109587193	Wp1l	-0.95	0.90	-0.94	0.88	0.89	17.6643313:566433769-1	cg24073074	-0.09	0.01	1.55E-02	No	DIST.	783	1.65	-1.96
18	cg37485888	1	133871333		-0.91	0.83	-0.98	0.95	0.89	-	-	-	-	-	-	-	-	1.92	-2.21
19	cg46095446	8	105270822	Hsf4	0.93	0.87	0.95	0.91	0.89	16.67199615:67199736-1	cg04235075	0.25	0.06	1.43E-10	Yes	HOM.	154	-0.34	2.73
20	cg29045784	10	118049610		-0.93	0.86	-0.96	0.91	0.89	12.68799873:68799997-1	cg11783364	-0.09	0.01	2.68E-02	No	DIST.	203	1.15	-1.95
21	cg31653077	13	56597874		-0.93	0.87	-0.95	0.90	0.89	5.135352606:135352728-1	cg15831285	-0.05	0.00	1.59E-01	No	DIST.	6229	1.47	-1.71
22	cg30271977	11	119210851	Tbc1d16	-0.94	0.88	-0.94	0.89	0.88	17.77987452:77987465-1	cg26350921	-0.02	0.00	5.29E-01	No	DIST.	23	1.68	-2.18
23	cg41451397	4	129020517		-0.94	0.88	-0.94	0.89	0.88	1.3344864:34464979-1	cg19383974	-0.12	0.01	2.45E-03	No	DIST.	1279	1.86	-2.68
24	cg31999677	13	102652532		-0.94	0.89	-0.94	0.87	0.88	5.66532812:66532932-1	cg26096752	-0.10	0.01	7.15E-03	No	DIST.	2261	1.73	-2.18
25	cg40054396	3	95688305		-0.93	0.87	-0.95	0.90	0.88	1.150521140:150521261-1	cg04863713	0.01	0.00	7.41E-01	No	HOM.	-	1.45	-2.40
26	cg29838087	11	82139781		-0.92	0.84	-0.96	0.92	0.88	-	-	-	-	-	-	-	-	1.58	-2.40
27	cg34047092	16	28596352	Fgl12	-0.93	0.86	-0.95	0.89	0.88	3.192289143:192289267-1	cg14463292	-0.04	0.00	2.96E-01	No	HOM.	-	1.71	-2.12
28	cg38799160	2	110180245		0.93	0.86	0.94	0.89	0.88	11.27237674:27237797-1	cg04897044	-0.13	0.02	1.19E-03	No	DIST.	885	-0.13	1.70
29	cg31348426	13	30332850		-0.91	0.83	-0.95	0.91	0.87	-	-	-	-	-	-	-	-	1.14	-1.31
30	cg32016143	13	104398027	Adamts6	-0.92	0.85	-0.94	0.89	0.87	5.64558563:64558684-1	cg21878650	-0.36	0.13	1.21E-21	Yes	HOM.	-	2.33	-2.41
31	cg40893513	4	53263897		-0.93	0.86	-0.94	0.87	0.87	9.107826792:107826912-1	cg14085060	-0.14	0.02	1.95E-04	No	DIST.	363	1.98	-2.64
32	cg46214201	8	115704432		-0.89	0.79	-0.97	0.94	0.87	16.79631417:79631534-1	cg00509921	-0.24	0.06	3.92E-10	Yes	DIST.	855	2.22	-2.15
33	cg34675481	17	15378866		0.94	0.87	0.92	0.85	0.86	6.170602908:170603029-1	cg04050463	0.01	0.00	8.05E-01	No	DIST.	483	-0.68	1.54
34	cg42324007	5	76815820		-0.91	0.83	-0.95	0.89	0.86	4.571118501:57111861-1	cg20529129	-0.08	0.01	3.94E-02	No	DIST.	5986	1.55	-2.05
35	cg36213524	19	20601608	Akh1a1	-0.91	0.82	-0.95	0.90	0.86	9.75568271:75568385-1	cg01812894	-0.56	0.32	1.60E-56	Yes	DIST.	178	2.19	-2.20
36	cg45373288	8	11469288		0.93	0.87	0.92	0.85	0.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-1.35	2.52
37	cg33511505	15	76462525	Bop1	-0.91	0.82	-0.95	0.89	0.86	8.145326468:145326590-1	cg22726273	0.09	0.01	2.25E-02	No	DIST.	58285	1.89	-2.09
38	cg40499707	3	151762892		-0.90	0.81	-0.95	0.91	0.86	1.791026683:79102735-1	cg00458211	-0.08	0.01	4.87E-02	No	DIST.	8599	1.59	-2.47
39	cg36017697	18	83077948		-0.92	0.85	-0.93	0.86	0.85	18.73966158:73966340-1	cg22063692	-0.09	0.01	2.81E-02	No	DIST.	378	1.53	-1.99
40	cg46488091	9	21135157		-0.88	0.77	-0.97	0.93	0.85	-	-	-	-	-	-	-	-	1.71	-1.88
41	cg31490151	13	41910458		-0.92	0.85	-0.92	0.85	0.85	6.11868688:11868802-1	cg07106625	0.03	0.00	4.98E-01	No	DIST.	1470	2.30	-2.53
42	cg47356576	9	119559604		-0.86	0.74	-0.98	0.96	0.85	3.38671014:38671153-1	cg27329908	0.03	0.00	4.29E-01	No	DIST.	782	1.18	-1.56
43	cg29852252	11	83354586		-0.88	0.78	-0.96	0.91	0.85	17.34216866:34217002-1	cg08542715	0.06	0.00	1.59E-01	No	DIST.	1026	1.45	-1.59
44	cg29825068	11	80613715	Myo1d	0.84	0.70	0.99	0.99	0.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.21	1.52
45	cg39955278	3	84463739		-0.89	0.79	-0.94	0.89	0.84	4.153872273:153872416-1	cg13794807	0.00	0.00	9.75E-01	No	DIST.	593	1.32	-2.05
46	cg43021141	5	146461718	Wasf3	-0.86	0.74	-0.97	0.93	0.84	13.527251476:27251597-1	cg16579043	0.00	0.00	9.32E-01	No	DIST.	1940	1.00	-1.64
47	cg32173949	14	9606891	Fhit	-0.89	0.80	-0.93	0.87	0.84	3.59727185:9772308-1	cg20366397	0.04	0.00	3.50E-01	No	DIST.	12404	1.25	-1.55
48	cg35566435	18	32817719	Tslp	-0.87	0.76	-0.95	0.91	0.84	5.110409832:11040996-1	cg21145140	-0.03	0.00	4.97E-01	No	DIST.	447	1.64	-1.70
49	cg42423927	5	92856694	Shroom3	-0.95	0.91	-0.87	0.75	0.83	7.75606840:7560996-1	cg20254658	-0.03	0.00	3.78E-01	No	DIST.	5564	1.66	-2.13
50	cg43021142	5	146461730	Wasf3	-0.88	0.77	-0.94	0.89	0.83	13.27251488:27251597-1	cg16579043	0.00	0.00	9.32E-01	No	DIST.	1934	1.00	-1.94
51	cg35570411	18	33374105		-0.88	0.78	-0.94	0.88	0.83	5.111012892:111013017-1	cg18111924	-0.08	0.01	4.19E-02	No	DIST.	2584	1.48	-2.27
52	cg39792107	3	57512581		-0.85	0.72	-0.97	0.94	0.83	3.149302393:149302461-1	cg06728055	-0.16	0.03	2.73E-05	No	DIST.	8141	0.98	-1.17
53	cg33820666	15	103198533		-0.87	0.75	-0.95	0.91	0.83	-	-	-	-	-	-	-	-	1.20	-1.42
54	cg36073249	19	4046200	A0A494BAM8	-0.87	0.76	-0.95	0.90	0.83	-	-	-	-	-	-	-	-	1.04	-1.83
55	cg42582686	5	111201308		-0.87	0.76	-0.95	0.89	0.83	22.28542680:28542811-1	cg05838101	0.06	0.00	1.47E-01	No	DIST.	41188	1.27	-1.70
56	cg38749746	2	103284035		-0.90	0.81	-0.92	0.84	0.83	11.34663681:34663813-1	cg11715147	0.12	0.01	3.07E-03	No	DIST.	2313	1.95	-2.25
57	cg36221364	19	21440953	Gda	-0.88	0.77	-0.93	0.87	0.82	-	-	-	-	-	-	-	-	1.11	-1.69
58	cg40372598	3	13568958		-0.89	0.79	-0.92	0.85	0.82	4.103415165:103415301-1	cg06501333	0.03	0.00	4.72E-01	No	DIST.	3960	1.29	-2.21
59	cg38906534	2	124608648		-0.87	0.76	-0.94	0.88	0.82	15.48007990:48008113-1	cg14555697	-0.07	0.01	6.52E-02	No	DIST.	1104	1.45	-2.08
60	cg42208466	5	64045766		-0.86	0.73	-0.95	0.90	0.82	4.37769312:37769433-1	ch.4.37457342R	-0.02	0.00	6.44E-01	No	DIST.	11574	1.29	-2.23
61	cg28421573	10	44427617		-0.83	0.69	-0.97	0.95	0.82	6.106568110:106568240-1	cg16567330	-0.02	0.00	6.21E-01	No	DIST.	9383	0.75	-1.45
62	cg35566432	18	32817586	Tslp	-0.83	0.69	-0.96	0.93	0.81	5.110409665:110409815-1	cg21145140	-0.03	0.00	4.97E-01	No	DIST.	273	1.50	-1.60
63	cg34742950	6	57534096		-0.82	0.67	-0.97</												

令和7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

突然変異の生成には DNA 複製が密接に関与することが知られているが、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・細胞においても、突然変異やがんは生じる。このことは、DNA 複製に依存しない突然変異生成機構の存在を示唆している。本研究では、サイレントな組織・細胞における化学物質による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、細胞分裂抑制条件下における TAM および化学物質の影響を解析した。

令和7年度は、前年度に明らかにした S 期進行阻害条件を TAM 解析に適用し、Roscovitine (ROS) 処理により S 期進行を抑制した条件下で、ドキシサイクリン (DOX) 添加による転写誘導およびアルキル化剤であるエチルニトロソウレア (ENU) 処理が *gpt* 遺伝子変異体頻度に及ぼす影響を検討した。その結果、ROS により S 期進行を抑制した条件下においても、DOX 添加による転写誘導により *gpt* 変異体頻度が上昇することが示された。一方、ENU 処理条件下では、DOX 添加による転写誘導の有無によって *gpt* 変異体頻度に大きな差は認められなかった。以上より、CHO/TAM 解析系において、S 期進行抑制下でも転写誘導に伴う突然変異生成が生じ得ることが示唆された一方、今回の ENU 処理条件では、転写誘導が ENU による突然変異誘発性を明確に増強する傾向は認められなかった。

A. 研究目的

DNA 損傷が修復されないまま DNA 複製が行われると、損傷部位に由来する塩基置換、欠失、挿入などが固定され、突然変異が誘発される。したがって、DNA 複製と突然変異生成には密接な関連があり、活発に細胞分裂する組織では突然変異が生じやすい一方、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・細胞では、突然変異は生じにくいと考えられてきた。しかしながら、実際にはこのようなサイレントな組織・細胞においても突然変異やがんが生じることから、DNA 複製に依存しない、あるいは DNA 複製以外の細胞内反応と関

連した突然変異生成機構の存在が示唆される。

DNA 複製以外で DNA に直接関わる主要な細胞内反応として、遺伝情報の発現過程である転写が挙げられる。転写時には RNA ポリメラーゼの進行、DNA の一過性の一本鎖化、転写共役修復、R-loop 形成、DNA トポロジー変化など、DNA 構造および DNA 上のタンパク質複合体の状態が大きく変化する。これらの事象は、DNA 損傷の修復、残存、あるいは突然変異としての固定に影響を及ぼす可能性がある。このような転写に関連して生じる突然変異生成は、転写に関連した突然変異生成（Transcription-as

sociated mutagenesis; TAM) として知られている。

本研究では、サイレントな組織・細胞における化学物質による突然変異誘発メカニズムとして TAM に着目する。研究分担者がこれまでに樹立している CHO 系細胞をベースとした TAM 解析系 (CHO/TAM 解析系) を用い、細胞分裂抑制条件下において、転写誘導および遺伝毒性化学物質処理が突然変異生成に与える影響を明らかにすることを目的とした。

令和7年度は、前年度に CHO/TAM 解析系で明らかにした S 期進行阻害条件を実際の TAM 解析へ適用し、S 期進行抑制条件下において転写誘導が *gpt* 遺伝子変異体頻度に及ぼす影響、ならびにアルキル化剤 ENU による突然変異誘発性に転写誘導が与える影響を検討した。

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 細胞株を用いた。本細胞株は、突然変異解析の標的遺伝子である大腸菌 *gpt* 遺伝子を含む *gpt* カセットを有する λ ファージ DNA コンストラクトを、CHO Tet-On 3G 細胞に安定導入して作製したものである。本解析系では、Tet 応答性プロモーターの下流に *gpt* カセットが配置されており、ドキシサイクリン (DOX) 添加により *gpt* カセット上の転写を誘導することができる。転写誘導後、細胞ゲノム DNA 中に組み込まれた λ ファージ DNA 領域を *in vitro* packaging により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ることでプラスミド化し、*gpt* アッセイにより標的遺伝子上に生じた突然変異を解析する。

前年度においては、CHO/TAM 解析系で接触阻害や無血清培養では細胞分裂活性が十分には抑制されない一方、ALLN または Roscovitine 処理により S 期進行を抑制できる条件を見出しており、本年度はその条件を TAM 解析へ適用した。

図1に示した通り、具体的には、CHO-KTG5 細胞株に対して Roscovitine (ROS) を 20 μ M の濃度で 16 時間事前処理し、S 期進行を抑制した。また、比較対照として ROS を事前処理しない群も設定した。その後、ROS 存在下または非存在下で、遺伝毒性物質であるエチルニトロソウレア (ENU; Ethylnitrosourea) を 12 μ g/mL の濃度で 4 時間処理した。さらに、ENU 処理後、ROS 存在下または非存在下で DOX を 1 μ g/mL の濃度で 20 時間処理し、*gpt* カセット上の転写を誘導した。これにより、S 期進行抑制の有無、アルキル化剤処理の有無、および転写誘導の有無を組み合わせた処理群を設定し、各条件が *gpt* 遺伝子変異体頻度に及ぼす影響を解析した。

C. 研究結果

CHO-KTG5 細胞株を用いた TAM 解析において、各処理条件下で *gpt* 遺伝子変異体頻度を解析した (図2)。その結果、細胞周期阻害剤を処理せず、かつ ENU も処理しない条件では、DOX 添加により *gpt* 変異体頻度に弱い上昇が認められた。この結果は、DOX による *gpt* カセット上の転写誘導が、*gpt* 遺伝子上の突然変異生成を促進し得ることを示唆する。

ROS 単独処理群では、処理なし群と比較して *gpt* 変異体頻度の上昇が認められた。また、ROS 処理条件下においても、DOX 添加により *gpt* 変異体頻度がさらに上昇した。これは、ROS により S 期進行を抑制した条件下においても、*gpt* カセット上の転写誘導に伴い突然変異頻度が上昇し得ることを示す結果であった。

一方、ENU 処理群では、細胞周期阻害剤を処理しない条件において、ENU 処理により *gpt* 変異体頻度の明確な上昇が認められたが、DOX 添加によってさらに変異体頻度が上昇する傾向は認められず、むしろわずかな低下が見られた。

ROS および ENU を併用した条件では、ROS 単独処理群よりも高い *gpt* 変異体頻度を示した。このことから、S 期進行抑制条

件下においても、アルキル化剤である ENU による突然変異誘発性が認められることが示唆された。しかしながら、ROS および ENU の併用条件下では、DOX 添加による *gpt* 変異体頻度の明確な変化は認められなかった。

以上の結果から、CHO/TAM 解析系において、S 期進行を抑制した条件下でも転写誘導により *gpt* 変異体頻度が上昇することが示された。一方、今回の ENU 処理条件下では、DOX 添加による転写誘導が ENU 誘発突然変異を明確に増強する傾向は認められなかった。

D. 考察

本研究では、CHO-KTG5 細胞株を用いた CHO/TAM 解析系において、S 期進行抑制条件下での転写誘導および ENU 処理が *gpt* 遺伝子変異体頻度に及ぼす影響を解析した。前年度までの検討により、CHO/TAM 解析系では接触阻害や無血清培養では細胞分裂活性が十分には抑制されない一方、CDK 阻害剤等の処理により S 期進行を抑制できることが明らかになっていた。本年度はこの知見に基づき、ROS 処理による S 期進行抑制条件で TAM 解析に適用した。

DOX 添加のみで *gpt* 変異体頻度が上昇する傾向は、これまでの先行的な検討でも観察されていた。本年度の結果においても、細胞周期阻害剤非処理かつ ENU 非処理条件下で DOX 添加により弱い *gpt* 変異体頻度の上昇が認められたことから、*gpt* カセット上の転写誘導そのものが、標的遺伝子上の突然変異生成に寄与する可能性が支持された。

また、ROS による S 期進行抑制条件下でも DOX 添加により *gpt* 変異体頻度が上昇した。このことは、DNA 複製の寄与を相対的に低下させた条件下においても、転写誘導に関連した突然変異生成が生じ得ることを示唆している。TAM は、細胞分裂が乏しい組織・細胞において突然変異が生じる機構を理解するうえで重要な概念であり、

本結果は、CHO/TAM 解析系がその解析に有用であることを示すものである。

一方で、ROS 単独処理により *gpt* 変異体頻度が処理なし群よりも上昇した点については、慎重な解釈が必要である。ROS は S 期進行抑制を目的として使用しているが、細胞周期制御以外の細胞内反応にも影響を及ぼす可能性がある。したがって、ROS 処理自体が DNA 損傷応答、修復、細胞生存性、あるいは変異体選択に影響した可能性も考慮する必要がある。今後は、ROS 以外の S 期進行阻害条件との比較、処理濃度および処理時間の最適化、細胞毒性および細胞周期状態の詳細な確認を行うことで、S 期抑制条件下での TAM の寄与をより明確に評価する必要がある。

ENU 処理条件では、ENU 単独処理により *gpt* 変異体頻度が上昇したことから、CHO/TAM 解析系において ENU のアルキル化剤としての突然変異誘発性を検出できることが確認された。また、ROS と ENU の併用条件では、ROS 単独処理よりも高い *gpt* 変異体頻度が認められたことから、S 期進行抑制条件下でも ENU による突然変異誘発性が見られることが示唆された。

しかしながら、ENU 単独処理と ENU + DOX 処理を比較した場合、DOX 添加による *gpt* 変異体頻度の明確な上昇は認められなかった。同様に、ROS による S 期進行抑制条件下でも、ENU 処理と ENU + DOX 処理の間で *gpt* 変異体頻度に大きな差は見られなかった。したがって、今回の ENU 処理条件では、DOX 添加による転写誘導が ENU による突然変異誘発性を明確に増強するとは判断できなかった。

この理由として、ENU による DNA アルキル化損傷は、DNA 複製時のミスインコーポレーションにより突然変異として固定される寄与が大きく、今回の条件では転写誘導に伴う変異生成の寄与が ENU による変異誘発の背景に埋もれた可能性がある。また、ENU 処理濃度、処理時間、DOX による転写誘導タイミング、損傷修復の時間経過

などが、TAM の検出感度に影響している可能性も考えられる。

以上より、本年度の結果は、S 期進行抑制条件下でも転写誘導に伴う突然変異生成が生じる可能性を示す一方で、アルキル化剤 ENU による突然変異誘発性と TAM との関係については、処理条件のさらなる最適化が必要であることを示している。今後は、ENU 以外の作用機序を有する遺伝毒性物質、異なる DNA 損傷型、転写誘導のタイミング、S 期抑制条件の違いを比較することで、化学物質誘発性 TAM の検出条件を明確化する必要がある。

E. 結論

本分担研究では、サイレントな組織・細胞における化学物質による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 (TAM) に着目し、CHO-KTG5 細胞株を用いた CHO/TAM 解析系により、S 期進行抑制条件下での転写誘導および ENU 処理が *gpt* 遺伝子変異体頻度に及ぼす影響を解析した。

その結果、ROS により S 期進行を抑制した条件下においても、DOX 添加による転写誘導により *gpt* 変異体頻度が上昇することを明らかにした。この結果は、DNA 複製の寄与が低下した条件下でも、転写誘導に関連した突然変異生成が生じ得ることを示唆している。

一方、アルキル化剤 ENU を処理した条件では、ENU による *gpt* 変異体頻度の上昇は認められたものの、DOX 添加による転写誘導が ENU 誘発変異体頻度を明確に増強する傾向は認められなかった。したがって、今回の ENU 処理条件では、ENU 誘発突然変異に対する転写誘導の寄与は限定的である可能性が示された。

以上より、CHO/TAM 解析系は、細胞分裂抑制条件下における転写関連突然変異生成を解析するための有用な実験系であると考えられた。今後は、異なる遺伝毒性物質、処理濃度、処理時間、転写誘導条件、ならびに

S 期進行抑制条件を組み合わせることで、化学物質による TAM の検出条件およびその機構をより詳細に明らかにする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Matsumoto M, Natsume M, Iso T, Umano T, Murata Y, Masumura K, Horibata K, Sugiyama KI. Increased mutagenicity in the liver of MutaMouse females following oral treatment with commercial-grade toluene diisocyanate. *Genes Environ.* 2025;47:12.

G.2 学会発表

1. 増村健一, 安東朋子, 堀端克良, 石井雄二, 杉山圭一: マウスを用いたアクリルアミドの *in vivo* 変異原性と次世代に誘発される生殖細胞系列突然変異の解析. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7)
2. 吉田愛海, 江田侑未, 杉山圭一, 堀端克良: 遺伝情報発現に付随する突然変異誘発と細胞周期の影響. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
3. 江田侑未, 佐々木沙耶, 吉田愛海, 杉山圭一, 堀端克良: クロマチン画分上の DNA 損傷応答解析を利用した遺伝毒性反応の検出. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
4. 松本真理子, 磯貴子, 馬野高昭, 大道友香, 広瀬望, 若山美智子, 増村健一, 堀端克良, 杉山圭一: グリシジルメタクリレート経口投与による雄 MutaMouse における *in vivo* 変異原性の検討. 日本環境変異原ゲノム学会

別添 4

第 54 回大会 (2025.11)

5. 羽倉昌志, 須井哉, 川上久美子, 加藤雅之, 皿田巳子, 杉山圭一, 堀端克良, 峯川和之, 山本美佳, 山田雅巳: TA100 株の感受性の違いについての一考察 (BMS pilot study). 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
6. グルーズピーター, 山田雅巳, 堀端克良, 杉山圭一: AlkB と触媒活性を欠損した DNA ポリメラーゼ IV が Ames 試験で hisG46 標的の変異誘発に及ぼす影響. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)

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. TAM解析に適用したS期進行阻害剤等の処理条件

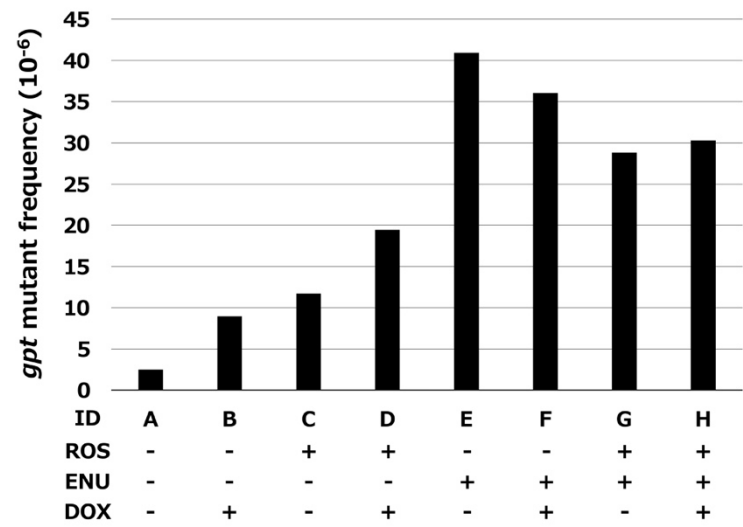


図 2. TAM解析における各実験区での *gpt* 変異体頻度

神経細胞、ミクログリアの細胞老化指標の明確化を目指した検討

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
実験担当者 高橋 華奈子, 最上 由香里

研究要旨

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は、細胞老化との関連性を考慮した*in vitro*でのゲノム毒性評価法の開発が重要である。環境要因に起因する健康リスクを評価するためには、生体の加齢に伴う細胞老化とゲノムへの影響を評価する必要があるが、生体の細胞老化を評価出来る明確な指標は整備されておらず、困難となっている。そこで本研究では、正常老齢マウスおよび若齢マウスより脳細胞を単離し、ゲノム毒性評価を実施する。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、それぞれの細胞老化とゲノム毒性を検証する。さらに、加齢に伴う神経細胞、ミクログリアの細胞性状変化を生体レベル、細胞レベルで多角的に検証し、細胞老化の指標を抽出することを目指す。

本年度は、①若齢マウス(C57BL/6J 3ヶ月齢, ♂)、老齢マウス(C57BL/6J 24ヶ月齢, ♂)由来の神経細胞とミクログリアのゲノム毒性チームへの供給、②*in vivo* / *in vitro*での神経細胞/ミクログリアの細胞性状検討と細胞老化の指標の整備、を実施した。具体的には、昨年度確立した細胞採材プロトコルを用いて、若齢および老齢マウスの前脳より神経細胞とミクログリアを単離回収し、ゲノム毒性評価、シングルセルトランスクリプトーム解析、および長期細胞培養条件の整備等、各種実験を実施するための細胞供給体制を整備した。細胞性状の検出方法としては、培養下での細胞形態、細胞機能検討(*in vitro*)、脳凍結切片における細胞形態、細胞老化マーカー発現検討(*in vivo*)、シングルセルトランスクリプトーム解析(*in vivo*)を実施した。マウスの脳海馬領域の神経細胞とミクログリアの免疫染色解析の結果、今回用いた老齢マウス神経細胞/ミクログリアが確かに細胞老化状態であること、神経細胞とミクログリアに細胞老化進行度の差がある可能性が示唆された。今後、シングルセルトランスクリプトーム解析により、加齢に伴い細胞性状が変動する細胞集団の特定や、加齢に伴うエピジェネティクスな細胞性状変化と細胞老化の関連性を評価する。得られた結果に基づき、生体の細胞老化指標を抽出、整備することを目指す。本研究は、体細胞ゲノム毒性評価系構築のための基盤となることが期待される。

A. 研究目的

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は、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。加えて、化学物質に起因する健康リスクの蓋然性を評価するためには、生体の加齢に伴う細胞老化とゲノムへの影響を正しく評価する必要がある。しかしながら、現状、生体の加齢に伴う細胞老化を評価出来る明確な指標が整備されておらず、困難となっている。そこで本研究では、正常老齢マウスおよび若齢マウスより脳細胞を単離し、ゲノム毒性評価を実施する。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、それぞれの細胞老化とゲノム毒性を検証する。さらに、加齢に伴う神経細胞、ミクログリアの細胞性状変化を生体レベル、細胞レベルで多角的に検証し、細胞老化の指標を整備することを目指す。

本年度は、昨年度確立した細胞採材プロトコルを用いて、若齢、老齢マウス(C57BL/6J, ♂)より神経細胞、ミクログリアを単離回収し、

- ① ゲノム毒性評価(ゲノム毒性評価チームへの供給)
- ② シングルセルトランスクリプトーム解析(受託解析)

- ③ 長期細胞培養条件の整備

- ④ マウスの脳凍結切片の免疫染色

上記の実験を実施した(図1)。若齢、老齢マウスの神経細胞、ミクログリアを用い、ゲノム毒性評価(①)、単一細胞レベルの細胞性状解析(②)、生体における形態学的変化と細胞老化マーカーの発現解析(④)より、加齢に伴うエピジェネティクスな細胞性状変化と細胞老化の関連性を評価する。細胞老化指標を整備するための基盤データを取得し、個体の老化に伴う細胞老化と、ゲノム毒性の関連性を評価する。本研究は、体細胞ゲノム毒性評価系構築のための基盤となることが期待される。

B. 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)、はMiltenyi Biotec社より入手した。Anti-LaminB1(ab16048)、Anti-p21(ab188224)、Anti-MAP2(ab5392)は、Abcam社より入手した。Anti-Iba1(GTX100042)、Anti-CD68(GTX41865)はCeneTex社より入手した。DAPI(342-07431)、PI(343-07461)はDojindo社より入手し

た。VECTASHIELD(H-1000)はVector Laboratories社より入手した。Alexa Fluor goat anti-rabbit IgG (A11034)、Alexa Fluor goat anti-mouse IgG (A11029)はInvitrogen社より入手した。10X G-Activate pH9(ARSE9-01)はGenoStaff社より入手した。Anti-Iba1 (090-19741)はWako社より入手した。Poly-L-Lysine(P9155)はSigma-Aldrich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)、DMEM(11965-0921)、F12(11765-054)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Dojindo社より、8 well chambered coverslip(80826)はibidi社より入手した。Senescence β -Galactosidase Staining Kit (#9860)は、Cell Signaling Technology社より入手した。GEM-X Flex Sample Preparation v2 Kit (PN-1000781)は、10X GENOMICS社より入手した。OCT-compounds(4583)は、サクラファインテックジャパン社より入手した。

実験動物

若齢マウス(C57BL/6J 3ヶ月齢, ♂)、老齢マウス(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。

脳組織分散と細胞単離

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。

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。

細胞ポピュレーション解析

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、Viability 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、CD45-FITC、CD11b-PE、TMEM119-Coralite647、Viability 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。

ミクログリア培養

神経細胞陰性分画を、Poly-L-Lysine(10 μ g/mL、3時間、室温; P9155、Sigma-Aldrich)でコートしたT25フラスコに播種した。培地は、10%牛胎児血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシン(15140-122、Gibco)を含むDMEM/F12(11965-092、Gibco; 11765-054、Gibco)を基礎培地とし、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF、10 ng/mL、315-02、PeproTech)およびトランスフォーミング増殖因子 β 1(TGF- β 1、50 ng/mL、100-21、PeproTech)を添加した。培地は2~3日に1回交換し、3~4週間培養後、フラスコを振幅約20cmで毎分60回程の早さで1-2分間振盪し、回収した培地中の細胞をPoly-L-Lysineコート 8 well chambered coverslip(80826、ibidi)に播種した。

免疫細胞染色

8 wellチャンバーに播種後、ミクログリア用培養プロトコル用いて1日間培養した細胞標本を、ミクログリアマーカーIba1(1:500、090-19741、Wako)及びHoechstの2重

染色を行った。免疫染色後の標本は、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。

免疫組織染色

マウスを深麻酔下で心灌流し脱血した後、4% PFAにより灌流固定を行った。脳を摘出し、4% PFA中で一晩固定した後30% sucrose 溶液で置換し、OCT-compoundsに包埋した。クライオスタット(CM3050、Leica)を用いて、30 μ m スライス切片を作成しスライドに接着させ、スライス標本作製した。スライス標本は、必要に応じ、熱賦活化抗原開示処理を行った。その後、0.3% TritonX、3% Goat Serum-PBS中にて室温3時間インキュベーションし、一次抗体(Anti-MAP2, 1:100, Anti-Iba1, 1:500, Anti-CD68, 1:100, Anti-LaminB1, 1:10000, Anti-p21, 1:1000)にて4°C 16時間インキュベートした。洗浄後、二次抗体(Anti-rabbit or mouse IgG, 1:1000)にて室温2時間インキュベーションした後、洗浄後DAPI(1:1000)でカウンターステインした。洗浄した後、切片を乾燥させ、蛍光退色保護剤を滴下し、カバーガラス内に封入した。LaminB1、p21は、Tris-EDTAバッファ(pH 9.0)を用いた熱媒介抗原回収を実施した。

染色画像は共焦点レーザー顕微鏡システムA1R(Nikon)を用いて撮像し、NIS-Elementを用いて解析を行った。

β -Galactosidase(SA- β -Gal)染色

SA- β -Gal 染色は、Senescence β -Galactosidase Staining Kit(Cell Signaling Technology)を用いて実施した。厚さ30 μ mの凍結脳薄切標本に β -Galactosidase Staining溶液を滴下し、37°Cで24時間インキュベーションした。その後、オールインワン蛍光顕微鏡BZ-X710(KEYENCE)を用いて撮影を行った。

シングルセルトランスクリプトーム解析(Flexサンプル作成)

若齢、老齢マウス由来神経細胞および若齢、老齢マウス由来ミクログリアは、各群9匹のマウスより採材し、プールした。単離した神経細胞およびミクログリア細胞はGEM-X Flex Sample Preparation v2 Kit (PN-1000781、10X GENOMICS)を用いて固定化した。固定化細胞はPIを用いてセルカウントした後、Stock溶液中に細胞を分散し、-80°Cにて凍結保存した。作成したFlexサンプルは、タカラバイオ遺伝子解析センターに送付し、Chromium GEM-X Fixed RNA ライブラリー作成、NovaSeqシーケンシング、Cell Rangerを用いたシングルセル発現解析を実施した。

(倫理面の配慮)

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験委員会の承認(承認番号1012)を得て、規定に則り、適切に実施した。

C. 研究結果

図1に、若齢マウス(C57BL/6J 3ヶ月齢, ♂)、老齢マウス(C57BL/6J 24ヶ月齢, ♂)由来神経細胞、ミクログリアの細胞採材、ポピュレーション解析、各種実験の流れを示す。脱血後脳サンプルは、氷冷下において前脳領域を摘出し、秤量した。細胞採材に用いたマウスの体重は、若齢マウスと比較して老齢マウスでは37.4%増大しているのに対し、前脳領域の重量は、ほとんど変化していないことが示された。

前年度確立した細胞分散単離プロトコルに基づいて、マウス前脳より脳細胞分散液を精製し、神経細胞、ミクログリアに単離した。単離した神経細胞、ミクログリアの細胞数、純度をMACSQuant Analyzer10で検証した代表

的な結果を下記に示す。神経細胞では、若齢マウス；細胞数 1.23×10^5 、純度96.48%、老齢マウス；細胞数 5.84×10^4 、純度96.58%であることが明らかになった。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陽性細胞は、若齢マウス；純度87.47%、老齢マウス；純度84.23%であることが示された。一方、ミクログリアでは、若齢マウス；細胞数 1.83×10^5 、純度92.23%、老齢マウス；細胞数 1.56×10^5 、純度92.48%であることが明らかになった。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陽性細胞は、若齢マウス；純度70.99%、老齢マウス；純度74.91%であることが示された。また、いずれの細胞も生存率は95%以上であった。上記の結果は若齢マウス(n=3)、老齢マウス(n=3)で検証し、再現性を確認している。

図1に示すように、回収細胞は、①ゲノム毒性評価サンプル、②シングルセルトランスクリプトーム解析、③細胞培養に使用した。加えて、④免疫組織染色を行った。

① ゲノム毒性評価

単離した細胞を用いて、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評価を開始した(ゲノム安全科学部)。若齢マウスおよび老齢マウス1個体から神経細胞、ミクログリアをそれぞれ単離した。若齢マウスから、神経細胞8例、ミクログリア5例を、老齢マウスから神経細胞8例、ミクログリア5例を細胞懸濁液として、ゲノム毒性評価チームへ供給した。

② シングルセルトランスクリプトーム解析

単離した細胞のシングルセルレベルでの細胞性状を解析するため、シングルセルトランスクリプトーム解析を実施した。若齢マウス、老齢マウスより、神経細胞、ミクログリアを単離した。GEM-X Flex Sample Preparation v2 Kitを用いて、4°Cで23時間固定した。固定した神経細胞、ミクログリアはPI染色して細胞核数をカウントした後、-80°C保存した。細胞単離は複数回に分けて実施し、固定化凍結サンプルをプールした。PIカウント数として、神経細胞(若齢マウス9個体より； 1.51×10^6 細胞、老齢マウス9個体より； 1.22×10^6 細胞)、ミクログリア(若齢マウス9個体より； 3.57×10^6 細胞、老齢マウス9個体より； 3.80×10^6 細胞)を回収することができた。GEM-X Flexシングルセルゲノム解析はタカラバイオ株式会社遺伝子解析センターに委託した。図2に示すように、神経細胞(若齢)、神経細胞(老齢)、ミクログリア(若齢)、ミクログリア(老齢)の4つのデータセットを得た。今後、神経細胞の若齢・老齢比較、ミクログリアの若齢・老齢比較の高次解析を実施し、細胞種アノテーション、遺伝子発現変動解析に基づき、加齢に伴い細胞性状が変動する細胞集団の特定や、加齢に伴うエピジェネティクスな細胞性状変化と細胞老化の関連性を評価する予定である。

③ 細胞培養

若齢および老齢マウス由来のミクログリア細胞を用いた*in vitro*評価系の構築を目的として、ゲノム解析に使用しない神経細胞陰性画分の細胞を用いて、ミクログリア細胞の長期培養および細胞数増幅プロトコルの整備を試みた。4週間の長期培養後、振盪操作により回収した培地中の細胞を免疫染色した結果、若齢マウスでは 1.47×10^5 細胞、老齢マウスでは 5.2×10^4 細胞のIba1陽性ミクログリアが確認出来た。

④ 免疫組織染色

生体レベルでの神経細胞とミクログリアの加齢に伴う

細胞性状変化と細胞老化を評価し、老化指標を明確化するため、免疫組織染色を行った。若齢マウス5例、老齢マウス4例の脳固定サンプルよりスライス切片を作成し、神経細胞、ミクログリアの選択的マーカー抗体および細胞老化マーカー抗体を用いて染色を行った。代表的な染色像を図3に示す。神経細胞はMAP2(A)、ミクログリアはIba1(B)、CD68(B c)でそれぞれ染色した海馬領域を示している。MAP2は微小管を調節するチューブリンタンパク質であり、神経細胞の細胞体、樹状突起に発現する。図Aで示すように、若齢マウスの海馬CA1、DG領域では、神経細胞の構造が明確に観察できている。一方、老齢マウスでは、MAP2シグナルが弱くなり、突起構造も不連続になっている。Iba1は単球やマクロファージで発現するCa²⁺結合蛋白タンパク質であり、ミクログリアのマーカーとして用いられる。Bは海馬CA1領域の染色像を示しているが、若齢マウスと比較して、老齢マウスではIba1陽性ミクログリアの細胞数が増大し、形態も突起が短く細胞体が大い活性型へと変化している。B cではCD68の染色像を示す。CD68は主にリソソーム、エンドソームに局在し、貪食活性化したミクログリアのマーカーとして用いられる。矢頭で示すように、老齢マウスのCA1領域では、CD68+Iba1+ミクログリアが複数観察でき、貪食活性の亢進したミクログリアが多数存在していることが示された。C aには、海馬CA1領域Iba1陽性ミクログリア細胞体で観察される、CD68シグナルを示している(黄色矢頭)。若齢マウスと比較して、老齢マウスでは、大きく、高いシグナル強度を示す、複数のCD68シグナルが示されている。C bには、CD68シグナルの定量解析結果を示している。老齢マウスではIba1陽性ミクログリアに局在するObject数(C b左)、総シグナル強度(C b右)が有意に増加しており、貪食活性が亢進している事が示されている。

さらに、2024年に細胞老化実験ガイドライン(Ogrodnik et al., Cell 2024 187(16):4150-4175.)で提唱された細胞老化マーカーについても検討した(図4)。Lipofuscinは酸化したタンパク質や脂質により構成された凝集体であり、加齢とともにリソソーム内に蓄積する不溶性の色素である(A a)。自家蛍光を発することから、aで示すように、ピンク色のシグナルとして観察できる。老齢マウスでは海馬神経細胞層に沿って、若齢マウスでは観察できないドット状のLipofuscinのシグナルが観察できることが示された。右図はCA1領域の拡大図を示しているが、老齢マウスで観察される細胞核周辺のドット状のLipofuscinシグナルが、若齢マウスではほとんど確認できない。A bでは核膜の裏打ち網目状構造ラミナの主要成分であるLaminB1の染色像を示している。LaminB1は高密度な繊維状構造を構成するタンパク質であるが、細胞老化とともにその発現が低下することが報告されている。bで示すように、若齢、老齢マウス双方において染色像が確認できたが、老齢マウスではLaminB1発現が低下している細胞核が多いことが示された。A cではサイクリン依存性キナーゼ阻害因子であるp21の染色像を示している。矢頭で示すように老齢マウスでは、p21のシグナルが強く、発現細胞数が増大していることが示された。dではβ-gal染色像を示す。矢頭で示すように、老齢動物では青色のシグナルを有する、β-gal陽性細胞が観察出来た。また、上記の老化マーカーについて、神経細胞、ミクログリアのマーカーと共染色し、細胞種ごと、領域ごとの発現と局在の定量解析を進めている。Bでは、p21の定量解析結果を示している。B aは、若齢、老齢マウスの海馬領域CA1領域のp21、Iba1、Lipofuscin、DAPIの染色画像であり、インセットに代表的なミクログリア、神経細胞のp21シグナル像を示して

いる。細胞核でROIをとり細胞核内部のp21シグナルを定量化した(核内のp21ドット数、核内のp21面積%、核内のp21平均シグナル強度、B b)。神経細胞、ミクログリア共に、老齢動物において、核内のp21シグナルが急激に増大していた。老齢動物のp21シグナルを神経細胞、ミクログリア間で比較した結果、核内のp21ドット数は神経細胞が多い一方で、核内のp21面積と平均シグナル強度はミクログリアが高い数値を示した。すなわち、ミクログリア核内部のp21シグナル陽性領域は、蛍光強度が高く、大きい。一方、神経細胞核内部のp21シグナル陽性領域は蛍光強度が低く、小さな領域が多数存在していることが示された。この結果は神経細胞とミクログリアの細胞種間における老化進行度と細胞分裂能の違い等を考察する上で重要な情報であり、さらなる検証が必要である。

以上のデータから、老齢マウスの神経細胞、ミクログリアが細胞老化フェノタイプを獲得していることが明らかになった。また、神経細胞とミクログリア間で細胞老化の進行度に差がある可能性も示された。2024年に細胞老化実験ガイドラインで提唱された細胞老化マーカーは*in vitro*実験データを根拠にするものも多いが、我々のデータはこれらが*in vivo*実験においても有効である事を示す実証データでもある。

D. 考察

免疫組織化学的検討から、老齢動物の海馬領域において神経細胞およびミクログリアの形態学的変化が観察された。さらに、2024年に細胞老化実験ガイドライン(Ogrodnik et al., Cell 2024 187(16):4150)で提唱された細胞老化マーカーについても検討し、Lipofuscinが老齢マウス海馬神経細胞に顕著に蓄積していることを確認した。ミクログリアにおいてもLipofuscin陽性細胞は見られたが、神経細胞に比べて細胞数、蓄積量共に少なかった。また、神経細胞、ミクログリアにおけるp21の核内蓄積を評価した結果、老齢マウスの神経細胞、ミクログリアにおいて、顕著にp21シグナルが増大していること、また、神経細胞と比較してミクログリアのp21シグナル数値と核内面積が高いことが示された。p21はその発現量に応じて、細胞周期、細胞老化を制御すること(Hsu et al., Cell 2019 178 361)、免疫応答性の遺伝子誘導を引き起こすこと(Sturmlechner et al., Science 2021 374 577)が報告されている。本研究で示された老齢マウスにおけるミクログリアと神経細胞のp21シグナルの相違は、異なる細胞種間の分裂能の相違に由来する細胞老化度の違いのみならず、免疫応答性シグナルの違いを反映している可能性がある。今後、LaminB1、PLIN2、4-Hydroxynonenal、 β -galなどのその他の老化指標についても検討し、考察を深める必要がある。さらに、モデル細胞として単離回収した神経細胞、ミクログリアのシングルセルトランスクリプトームの解析を進めている。高次解析、細胞アノテーション解析、発現変動解析を実施し、単一細胞レベルの加齢に伴うエピジェネティクスな細胞性状変化と細胞老化の関連性を評価する。さらに、加齢に伴って細胞性状が大きく変化する細胞集団を特定すると同時に、細胞老化指標を抽出し、

整備する。これらの検討により、老化にともない変動する細胞集団やそのエピジェネティクスな変化が明確化することが期待できる。また、採材した細胞から、より多くの指標を得るため、長期細胞培養の整備も進めている。上記の検討は、体細胞ゲノム毒性評価系構築のための基盤となることが期待される。

E. 結論

今年度は、ゲノム毒性評価のための細胞供給体制を整備することができた。さらに、シングルセルトランスクリプトーム解析や免疫組織学解析により、加齢に伴い細胞性状が変動する細胞集団の特定や、細胞老化指標の明確化を進めている。本研究で得られる知見は、環境要因によって悪化する健康リスクの理解を深め、ゲノム毒性評価系を構築するための基盤となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi K, Quan Z, Shigemoto-Mogami Y, Zhang B, Ohwada T, Abe I, Awakawa T, Sato K, Search for compounds with inhibitory effects on microglial activation in a small-molecule library constructed by synthetic biology. ACS Omega 2026, 11, 13, 20547-20558, doi:10.1021/acsomega.5c12080
2. Shigemoto-Mogami Y, Nakayama-Kitamura K, Sato K, Search for marker proteins to assess blood-brain barrier development, Front Neuroanat., 2026, 20, 1717532, doi:10.3389/fnana.2026.1717532

2. 学会発表

1. ヒト型血液脳関門(BBB)-MPSのBBB成熟段階を判定するための品質管理(Quality control: QC)項目の探索-脳微小血管周囲のグリア細胞立体配置およびBBB機能タンパク質発現に関する動物モデルでの検討-, 最上(重本)由香里、北村(中山)貴美子、佐藤 薫, 第32回HAB研究機構学術年会(藤沢 2025. 5)
2. Takahashi K, Quan Z, Awakawa T, Shigemoto-Mogami Y, Zhang B, Ohwada T, Abe I, Awakawa T, Sato K, Search for compounds with inhibitory effects on microglial activation in a small-molecule library constructed by synthetic biology. 第48回神経科学学会(新潟 2025. 7)
3. Shigemoto-Mogami Y, Nakayama-Kitamura K, Hoshikawa K, Sato K The role of microglia on the functional maturation of the blood brain barrier (BBB) in the rat postnatal cerebral cortex (C C). 第68回日本神経化学大会(愛知 2025. 9)
4. 最上(重本)由香里 ミクログリアの新しい生理機能の発掘を目指して ミニ口演 第68回日本神経化学大会(愛知 2025. 9)
5. 生後ラット blood brain barrier (BBB) 発達に伴う脳微小血管周囲グリア細胞立体配置およびBBBタンパク質発現変化に関する検討-BBB-生体模倣システム(MPS)の品質向上を目指して- 最上(重本)由香里、北村(中山)貴美子、佐藤 薫, 第153回薬理学会関東部会(山梨 2025. 10)

6. 鈴木孝昌、三島雅之、笠原杏南、最上由香里、高橋華奈子、佐藤 薫、杉山圭ー 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 第54回日本環境変異原ゲノム学会（静岡 2025. 11）
7. The temporal expression patterns of brain microvascular endothelial cells' proteins until blood-brain barrier (BBB) maturation-an attempt to make a recipe to determine the BBB developmental stage, Shigemoto-Mogami Y, Nakayama-Kitamura K, Sato K, 第3回MPS協議会学術シンポジウム(船堀 2026. 1)
8. Application potential of magnetic resonance imaging (MRI) in preclinical seizure risk evaluation, Shigemoto-Mogami Y, Takahashi K, Nakayama-Kitamura K, Suga K, Saito H, Sato K, 第17回日本安全性薬理研究会学術年会(大宮 2026. 2)
9. Analysis of genomic changes and phenotypic alterations associated with cellular senescence in neurons and microglia. 神経細胞、ミクログリアにおける細胞老化にともなうゲノム変化と表現系の解析 Shigemoto-Mogami Y, Takahashi K, Suzuki T, Izawa K, Masayuki M, Yanai S, Horibata K, Koizumi S, Sugiyama K, Sato K, 日本薬理学会第99年会（仙台 2026. 3）
10. ミクログリア活性化抑制化合物の探索天然物化合物から合成生物学的に創製したメロテルペノイドライブラリーの活用 Takahashi K, Quan Z, Shigemoto-Mogami Y, Zhang B, Ohwada T, Abe I, Awakawa T, Sato K, 日本薬学会第146年会(大阪 2026. 3)
11. 生後ラット大脳皮質血液脳関門(BBB)発達と血管周囲グリアの立体配置変動、BBB蛋白質発現変動の関連-BBB-生体模倣システム(MPS)の品質管理項目の抽出- 最上(重本)由香里、北村(中山)貴美子、佐藤 薫, 日本薬学会第146年会(大阪 2026. 3)

G.知的所有権の取得状況

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

図1 実験の流れ 老齢動物搬入、ゲノム毒性検出法確立、細胞老化指標抽出

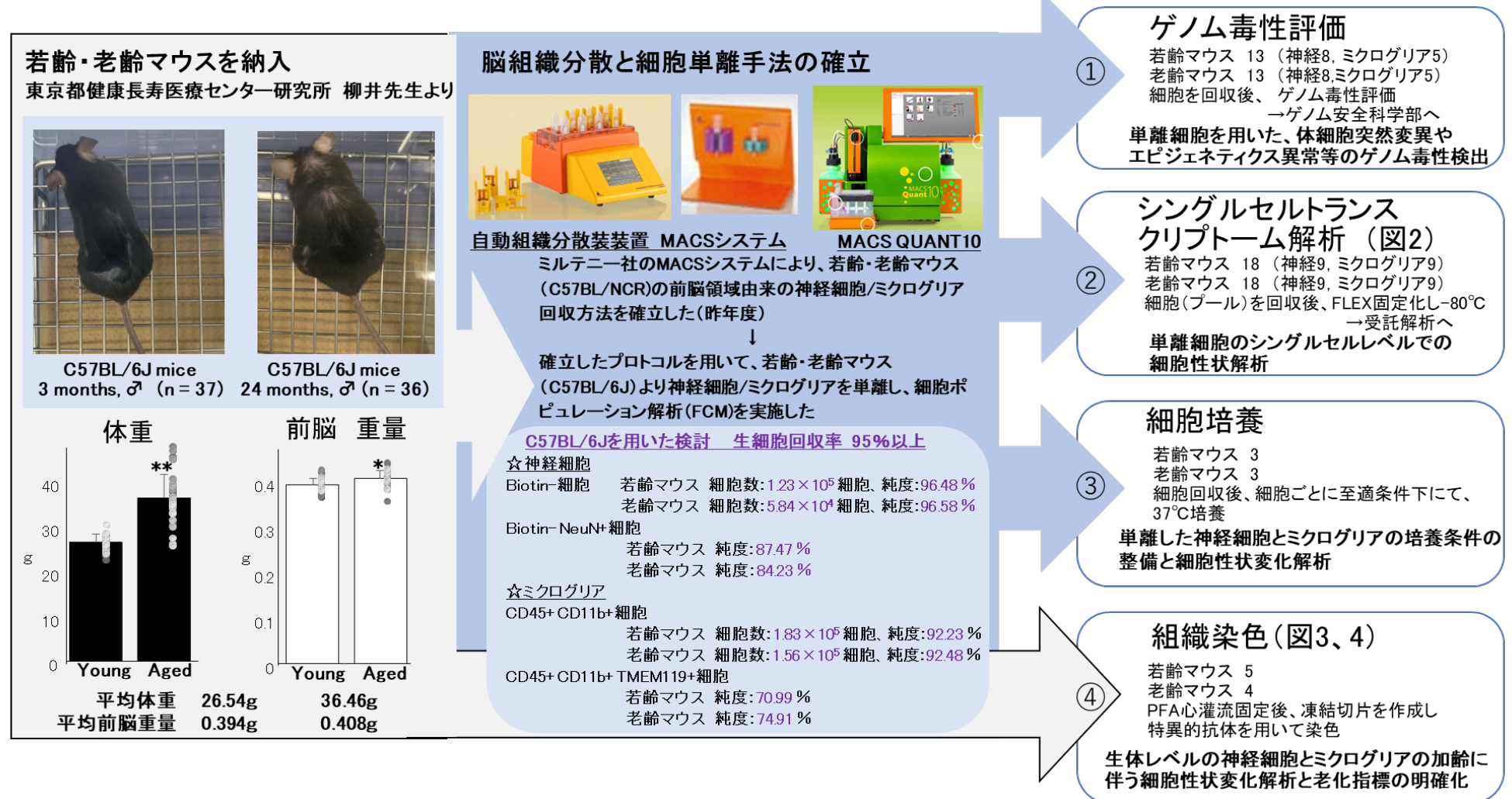
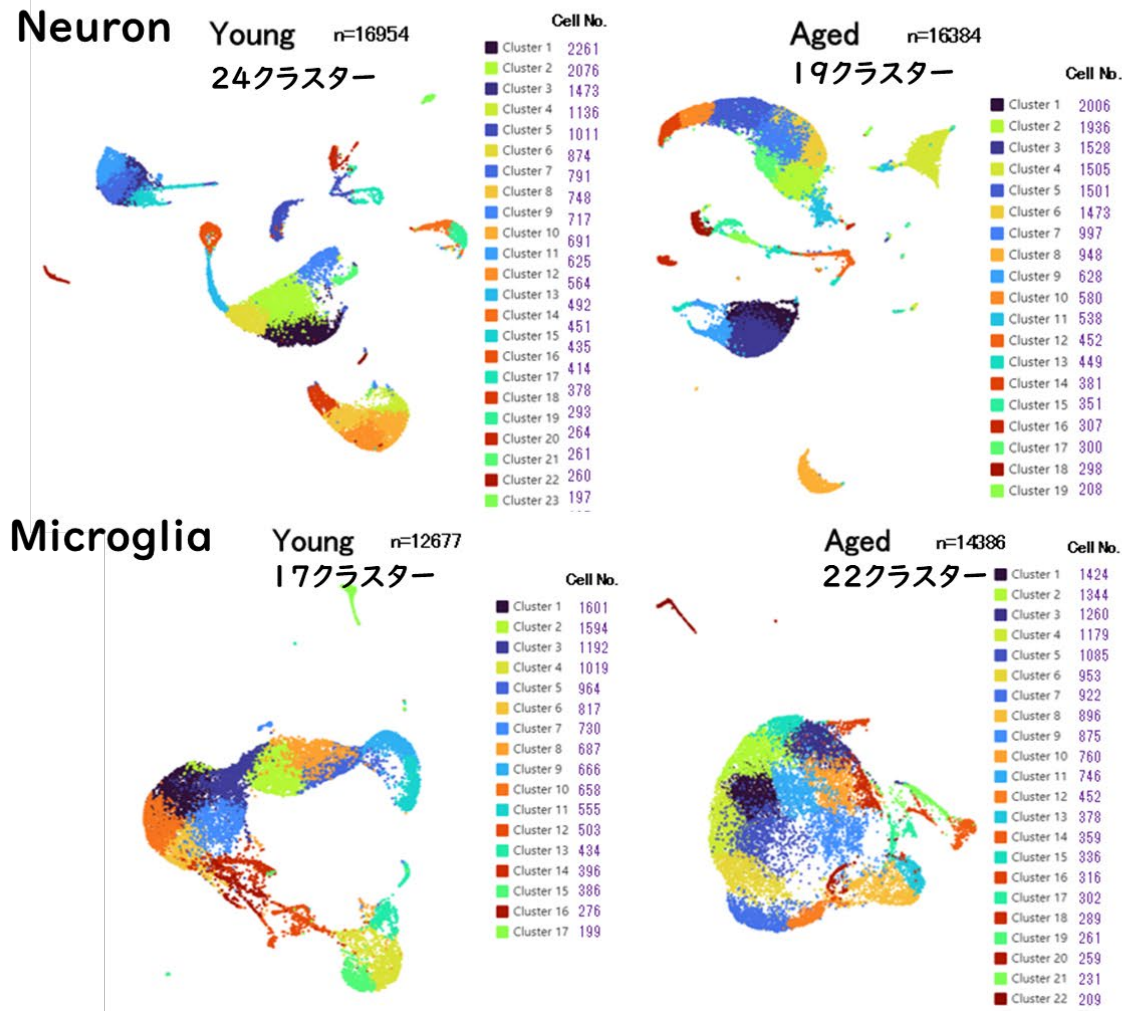


図2 シングルセル解析 概要



- 全解析細胞数 60,853細胞
- Confidently mapped reads in cells 96.8 %
- Fraction of initial cell barcodes passing high occupancy GEM filtering 100%
- Median gene per cell 3175

若齢、老齢神経細胞、若齢、老齢ミクログリア
4サンプルの細胞集団が確認できた



✓高次解析

- Neuron 若齢・老齢
- Microglia 若齢・老齢

✓細分化した細胞種アノテーション解析

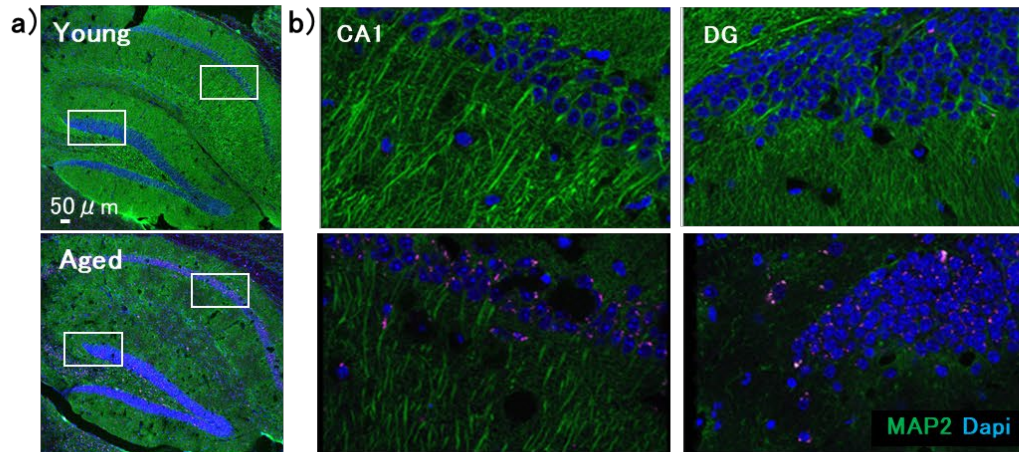
✓遺伝子発現変動解析



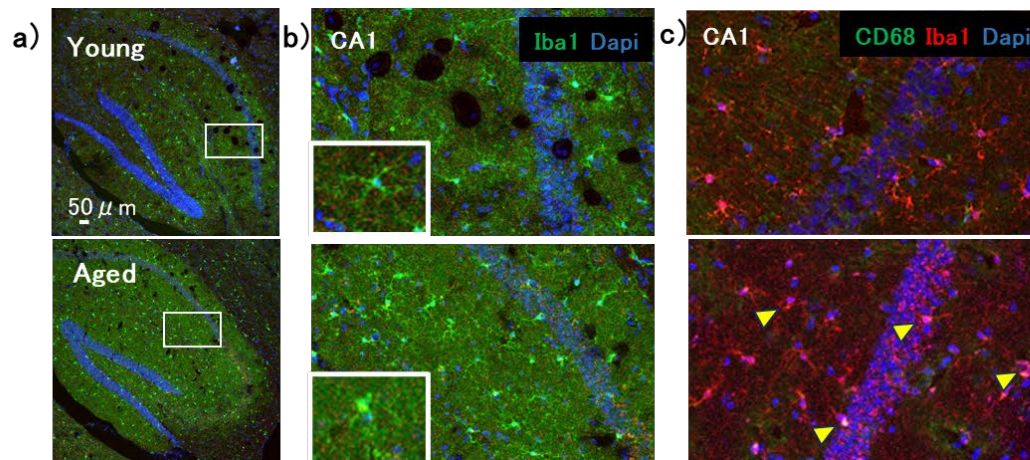
単一細胞レベルの特徴付け
細胞集団の性状変化、老化指標の明確化

図3 マウス海馬領域における神経細胞・ミクログリアの形態学的変化

A 神経細胞; MAP2



B ミクログリア; Iba1, CD68



C ミクログリア; Iba1, CD68

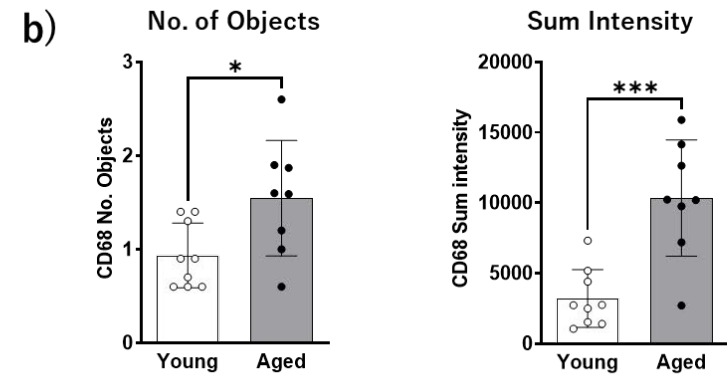
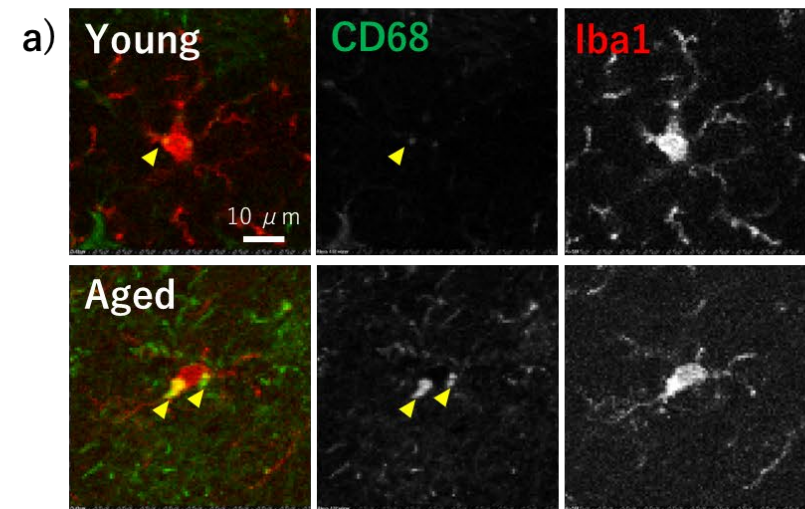
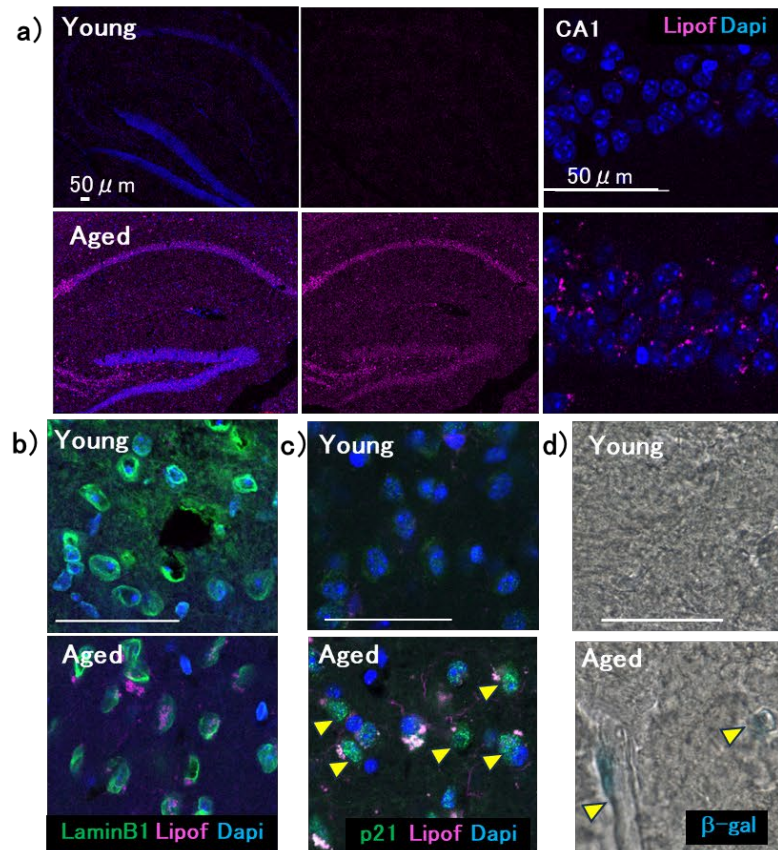


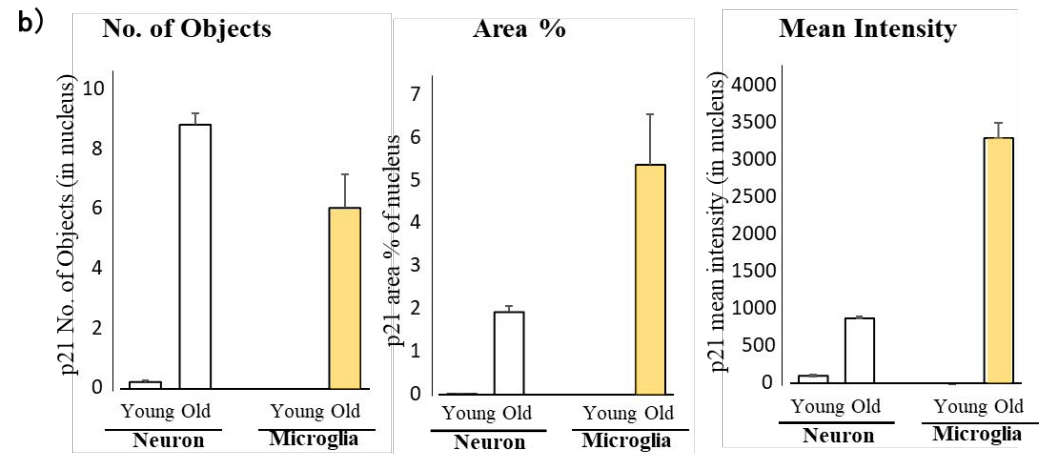
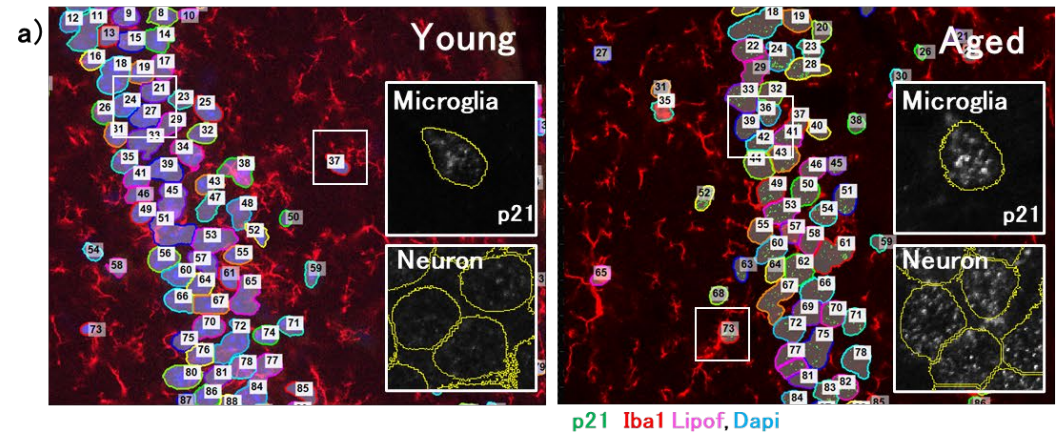
図4 マウス海馬領域における神経細胞・ミクログリアの老化マーカー発現解析

A Lipofuscin, p21, LaminB1, β -galactosidase



参考文献; Guidelines for minimal information on cellular senescence experimentation in vivo. Cell 2024 187(16):4150–4175.

B



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

老化によるゲノム毒性におけるミクログリアの役割を明らかにし、ミクログリアへの介入方法の開発を行った。これまで正常マウスを用い、colony stimulating factor-1 受容体 (CSF-1R) 拮抗薬の ON/OFF によるミクログリア「リセット」及びミクログリア移植により、ミクログリア置換法の最適化を行ってきた。本年は、老齢マウス（24ヶ月齢）を用いた検討を行った。老齢マウスのミクログリアは、数、形態ともに若年マウスのそれらと大きく異なっていた。老齢マウスのミクログリアは、アメボイド状の形態を呈し、また数も大きく低下していた。また老齢マウスは、CSF-1R 拮抗薬に対する感受性が低く、ミクログリアの除去率は低下していた。老齢マウスにおいて、ミクログリアの性質が大きく変化していること、これがゲノム毒性等周辺神経細胞へ大きく影響している可能性が示唆された。CSF-1R 拮抗薬によるミクログリアの除去も不完全であったが、リセットや移植等により、老齢マウスのミクログリアを置換する手法が確立できれば、ミクログリアに介入して加齢によるゲノム毒性等の最小化に貢献できる可能性が示唆された。

研究分担者

小泉 修一 山梨大学医学部 教授

A. 研究目的

ミクログリアは、脳内外の環境変化に極めて敏感な脳細胞であり、化学物質または老化による変化をいち早く受けやすい細胞である。またミクログリアは情報発信能力を持っているため、老化等によるミクログリアのゲノム毒性は、シナプス再編、ネットワーク再編等、脳の中核機能に大きな影響を与える。そこで本研究では、化学物質や老化により障害を受けたミクログリアを、正常、あるいは若齢ミクログリアと置換することで、ゲノム毒性等の生態影響を最小化する方法を開発する。本年度は、老齢マウスを用い、そのミクログリアの形態、性質、さらに置換技術に関する検討を行う。

B. 研究方法

研究には、24ヶ月齢の老齢マウスを用いた。ミクログリアの形態解析は、Iba1抗体を用いて行った。またミクログリア置換のための、ミクログリア除去はCology stimulating factor-1 受容体 (CSF-1R) 拮抗薬の PLX3397 (1, 200ppm) を餌に混ぜて、2週間投与することで行った。

（倫理面の配慮）

動物実験は、山梨大学動物実験安全委員会に計画書を提出し、承認を受けた後、山梨大学学長の許可の元で遂行した。

C. 研究結果

(1) 老齢マウスのミクログリア形態

ミクログリアの数及び形態は、老齢マウス（24ヶ月齢）と若齢マウス（3ヶ月齢）では大きく異なっていた。老

齢マウスのミクログリア数は、大脳皮質では約85%、海馬では約50%、と若齢マウスと比較して顕著に低下していた。ミクログリアの形態をSholl analysisで解析した。老齢ミクログリアはアメボイド状であり、突起の複雑性が海馬では約70%に、海馬では40%程度にまで低下していた。

(2) 老齢マウスミクログリアのCSF-1R拮抗薬PLX3397感受性

ミクログリアのPLX3397感受性は、老齢及び若齢で大きく異なっていた。PLX3397により、若齢ミクログリアは大脳皮質及び海馬ともに95%以上が除去された。老齢ミクログリアは、大脳皮質で約75%、海馬では約50%が除去されたに過ぎなかった。

D. 考察

老齢マウスでは、ミクログリアの数、形態及び CSF-1R 拮抗薬感受性が大きく低下しており、これらは、シナプス、神経細胞さらに周辺細胞機能の機能低下に寄与している可能性が示唆された。また脳部位による差異も認められ、脳部位特異的な機能低下との関連性が示唆された。今後は、老齢マウスにおいて、ミクログリアのリセット（除去/自己増殖）、移植による置換が可能であるか否かを確認し、置換法を最適化することで、これら老齢ミクログリアの毒性を最小化できるか否か、またそのメカニズムの解析を行う。

E. 結論

老齢ミクログリアは数・形態・機能が大きく低下していた。また、老齢ミクログリア独自の置換法開発も必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Shimozono K, Kim YJ, Hata T, Nan H, Saito K, Mori Y, Ueno Y, Isono F, Iwasaki M, **Koizumi S.** Ohtsuka T, Takiyama Y. (2025) 4-Phenylbutyric acid improves gait ability of UBAP1-related spastic paraplegia mouse model: Therapeutic potential of SPG80. **Int J Mol Sci.** Oct 8;26(19):9779. doi: 10.3390/ijms26199779.
- (2) Ono Y, Tanaka K, Sato E, Ito M, Zhang D, Honda M, Ogawa T, Tagaya H, Fukuda T, Shinozaki Y, Kato K, **Koizumi S.** Yoshino O. (2025) Activated eosinophil plays a role in promoting fibrosis in endometriotic lesion. **Sci Rep.** Jul 31;15(1):28015. doi: 10.1038/s41598-025-13855-x.
- (3) Kubota Y, Shigetomi E, Parajuli B and ***Koizumi S.** (2025) Astrocytes: Crucial signal transducers that convert norepinephrine inputs to ATP signaling in the brain. **Purinergic Signalling.** Aug 19. doi:

10.1007/s11302-025-10109-3s.

- (4) Parajuli B, Doi H, Shigetomi E, Suzuki H, Saito K, ***Sawada K, *Koizumi S.** (2025) Development of a label-free Ca^{2+} image sensor to visualize extracellular Ca^{2+} dynamics in the biological samples. **Biosensors and Bioelectronics (IF=10.5)**, June27, 287, 117729. doi: 10.1016/j.bios.2025.117729

2. 学会発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

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

研究要旨

4週齢で購入したマウスを長期飼育し、老化マウスの安定した供給体制を構築した。飼育期間中は健康状態の観察および病原微生物検査を継続的に実施し、良好な SPF 環境を維持した。実験開始直前（23ヶ月齢）の生存率は約 80%であり、当センターが保有する既存の生存曲線と概ね一致していた。また、観察された軽度の病変は、加齢性のものであると考えられた。以上より、本研究で作出・維持した老化マウスは、標準的な老化モデルとして妥当であり、老化研究の基盤的生物資源として有用であると考えられる。

A. 研究目的

マウスが十分に老化するためには約 2 年を要し、この時間が老化動物を用いる研究におけるボトルネックとなっている。そのため、老化動物を計画的に育成し、必要とされる時期に安定して供給できる体制の構築が求められる。本研究では、老化マウスを体系的に維持し、研究代表者、分担者の要請に応じて適切な時期に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、適齢に達するまで長期飼育を行った。飼育環境は温度 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、12時間の明暗サイクルとして、1 ケージあたり 4～5 匹で群飼育を行った。飼料と水は自由摂取とした。

品質管理のためケージ観察を毎日実施し、外観異常や行動異常などの健康状態を継続的に確認した。顕著な病理所見が見受けられた個体は解析対象から除外するとともに、エンドポイントに達した場合は速やかに安楽致死処置を施し、動物福祉へ配慮した。また、清浄度の維持・監視のため、囚動物を用いた病原微生物検査を3ヶ月に一度の頻度で実施した。検査対象はサルモネラ菌やLCMウィルスなどの人獣共通感染症に加え、日和見感染症関連病原体や飼育環境の指標となる15種の微生物とした。

長期飼育を実施するコホートについて、当センターが保有する老化マウスの生存曲線や病理所見発症率と比較検討を行い、飼育条件および個体特性の妥当性を評価した。

老齢マウスが23ヶ月齢、若齢マウスが2ヶ月齢に達した時、合計3コホートのマウスを国立医薬品食品衛生研究所と山梨大学へ輸送し、研究に供した。

（倫理面の配慮）

「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。また、動物福祉に十分配慮し、苦痛の軽減および適正な飼育管理に努めた。

C. 研究結果

研究期間中に実施した 4 回の病原微生物検査では、全検査項目で陰性を確認し、飼育環境が高い清浄度で維持されていることが示された。

また、3 コホートの老齢マウスについて、搬出時（23ヶ月齢）における生存率は 80%前後であった。さらに、いずれのコホートにおいても数個体に軽度の腹部膨満や被毛の脱落、痂皮形成などが認められた。いずれも加齢に伴う軽度の病変であり、重篤な異常は認められなかった。

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。研究で使用した3コホートの生存曲線は、当センターが保有する基礎データと概ね合致しており、ロット差による大きな影響は認められなかった。

また、病原微生物検査が陰性であったことから、本研究で用いたマウスは良好なSPF環境下で維持されており、感染症による影響を受けていないことが確認された。これにより、観察された病変は主として加齢に起因するものであると考えられる。

以上の結果から、本研究で作出・維持した老化マウスは、安定した条件下で飼育された標準的な老化モデルとして妥当であり、本研究における基盤的生物資源として有用であると考えられる。

E. 結論

次年度の研究実施に向け、複数コホートのマウスの飼育を継続する。また、定期的な病原微生物検査や健康観察も引き続き実施し、清浄環境の維持、並びに個体の健康状態の適切な管理に務める。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Shuichi Yanai. Cooperation between behavioral science and gerontology to better understand and attack cognitive decline in an aging world. Behavioral Science Research, 63, 123-134. (2025). doi 無し
- 2 Shipan Fan, Carina Ramallo-Guevara, Monika Frenzel, Shuichi Yanai, Sataro Goto, Michiru D. Sugawa, Norbert A. Dencher, Ansgar Poetsch. Not aging but calorie restriction strongly affects protein oxidation in heart and brain mitochondria. Aging Cell, 25, e70339 (2025). <https://doi.org/10.1111/ace.70339>

2. 学会発表

- 1 柳井修一・石神昭人. 9ヶ月齢までの C57BL/6 マウスにおける成長曲線と血液生化学の垂系統差と性差. 第 72 回日本実験動物学会総会, 名古屋国際展示場ポートメッセなごや, 2025/5/21-23
- 2 井上律子・柳井修一. 老化マウスの歩行とコエンザイム Q10 補充による介入. 第 48 回日本基礎老化学会大会. 幕張メッセ, 2025/6/27-29
- 3 柳井修一・遠藤昌吾. 老齢マウスにおける認知機能と身体機能の性差. 第 48 回日本基礎老化学会大会. 幕張メッセ, 2025/6/27-29
- 4 Shuichi Yanai, Tetsuro Tago, Jun Toyohara, & Shogo Endo. Phosphodiesterase 3 inhibition by cilostazol reverses spatial memory impairment associated with reduced neuroinflammation and increased cerebral glucose uptake in aged mice. 第 48 回日本神経科学大会, 朱鷺メッセ, 2025/7/24-27
- 5 柳井修一・遠藤昌吾. C57BL/6J マウスの行動学的表現型に基づく老化の様相. 第 59 回日本実験動物技術者協会総会. 米子市文化ホール・米子コンベンションセンター, 2025/10/23-25
- 6 柳井修一. 行動から探る老化のサイン—網羅的解析による表現型の定量—. 第 98 回日本生化学会大会, 京都国際会館, 2025/11/3-5
- 7 大友竣生・目時美和子・柳井修一・福井浩二. アデニンによる慢性腎臓病モデルでの全身性炎症と複合抗酸化物質によるその抑制効果の検討. 第 36 回腎とフリーラジカル研究会, 川崎医科大学総合医療センター, 2025/11/15
- 8 柳井修一. 年次大会とウィンターカンファレンスから振り返る日本行動科学学会 65 年の歩み. 日本行動科学学会第 41 回ウィンターカンファレンス. 軽井沢芸術倶楽部, 2026/2/9-11

9

Yukari Shigemoto-Mogami, Kanako Takahashi, Takayoshi Suzuki, Kazuki Izawa, Mishima Masayuki, Shuichi Yanai, Katsuyoshi Horibata, Shuichi Koizumi, Kei-ichi Sugiyama, Kaoru Sato. Analysis of genomic changes and phenotypic alterations associated with cellular senescence in neurons and microglia. 第 99 回日本薬理学会年会, 東北大学, 2026/3/16-18

G. 知的所有権の取得状況

別紙 4

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
柳井修一	野生動物と飼育動物の寿命	鳥羽研二、秋下雅弘、荒井康道、石神昭人、石崎達郎、更科功、鈴木隆雄	寿命の事典	朝倉書店	東京	2025	318-319

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
<u>Shigemoto-Mogami Y</u> , Nakayama A, Kitamura K, <u>Sato K</u> .	Search for marker proteins to assess blood-brain barrier development	Frontiers in Neuroanatomy	20	1717532	2026
Takahashi K, Qian Z, <u>Shigemoto-Mogami Y</u> , Zhang B, Ohwada T, Abe I, Awakawa T, <u>Sato K</u> .	Search for compounds with inhibitory effects on microglial activation in a small-molecule library constructed by synthetic biology	ACS Omega	11	20547	2026
Matsumoto M, Natsume M, Iso T, Umano T, Murata Y, Masumura K, <u>Horibata K</u> , <u>Sugiyama KI</u> .	Increased mutagenicity in the liver of Mutan Mouse females following oral treatment with commercial-grade toluene diisocyanate	Genes Environ	47	12	2025
Mishima M, <u>Izawa K</u> , Tsuda M, Higuchi Y, Uehara S, Suemizu H, <u>Sugiyama KI</u> .	Development of a DNA damage assay system using stable human hepatocytes.	Genes and Environment	48	3	2026

<u>Sugiyama KI</u> , Furuhashi A, <u>Horibata K</u> , Tsuda M, <u>Izawa K</u> , Tsuji G, Demizu Y, Matsushita K, Toyoda T, Hirabayashi Y, Saito Y, Honma M.	Assessment of mutagenic potential of puberulic acid contaminated in red yeast rice (beni-koji) health food supplements.	Mutagenesis	41	110-118	2026
鈴木 孝昌	Error-corrected next generation sequencing (ecNGS) の現状	毒性質問箱	27	50-55	2025
Yauk CL, Lynch AM, Dobrovolsky VN, Schuler M, Smith-Roe SL, Fitzgerald D, Higgins J, Honarvar N, Le Curieux F, Matsumura S, Minocherhomji S, Recio L, Salk JJ, <u>Sugiyama KI</u> , <u>Suzuki T</u> , Willis JW, Marchetti F.	Application of error-corrected sequencing technologies for in vivo regulatory mutagenicity assessment.	Regul Toxicol Pharmacol.	164	105985	2026
Honda H, <u>Suzuki T</u> , Kitajima M, Kondo NI, Miyata K, Utsumi S, Yamada M.	The new era shaped by environmental genome monitoring - symposium of the Japanese environmental mutagen and genome society (JEMS), 2024.	Genes Environ	47	6	2025
Matsumura S, Hosoi S, Hirose T, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Kawade A, Hakura A, Kakiuchi D, Asakura S, Koyama N, Okada Y, Chikura S, Kimoto T, Masumura K, <u>Suzuki T</u> , <u>Sugiyama KI</u> .	Whole genome mutagenicity evaluation using HawkSeq™ demonstrates high inter-laboratory reproducibility and concordance with the transgenic rodent gene mutation assay.	Genes Environ	47	13	2025
Ono Y, Tanaka K, Sato E, Ito M, Zhang D, Honda M, Ogawa T, Tagaya H, Fukuda T, Shinozaki Y, Kato K, <u>Koizumi S</u> , Yoshino O.	Activated eosinophil plays a role in promoting fibrosis in endometrial lesion.	Sci Rep.	15	28015	2025

Kubota Y, Shigetomi E, Parajuli B, <u>Koizumi S.</u>	Astrocytes: crucial transducers that convert norepinephrine inputs to ATP signaling in the brain.	Purinergic Signaling.	21	1237-1240	2025
Shimozono K, Kim YJ, Hata T, Nan H, Saito K, Mori Y, Neno Y, Iwasaki M, <u>Koizumi S</u> , Ohtsuka T, Takiyama Y.	4-Phenylbutyric Acid Improves Gait Ability of UBAP1-Related Spastic Paraplegia Mouse Model: Therapeutic Potential for SPG80.	Int J Mol Sci	26 (19)	9779	2025
Parajuli B, Doi H, Shigetomi E, Suzuki H, Saito K, Sawada K, <u>Koizumi S.</u>	Development of a label-free Ca ²⁺ image sensor to visualize extracellular Ca ²⁺ dynamics in the biological samples	Biosens Bioelectron.	287	117729	2025
<u>Shuichi Yanai</u>	Cooperation between behavioral science and gerontology to better understand and attack cognitive decline in an aging world	Behavioral Science Research	63 (2)	123-134	2025
Shipan Fan, Carolina Ramallo-Guevara, Monika Frenz, <u>Shuichi Yanai</u> , Sataro Gotō, Michiru D. Sugawara, Norbert A. Dencher, Ansgar Poetsch.	Not aging but calorie restriction strongly affects protein oxidation in heart and brain mitochondria	Aging cell	25	e70339	2025

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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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・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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☒	☐	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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。

令和8年3月30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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 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 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)	☐ ☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ ☒	☐		☐
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	☒ ☐	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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：)	☐ ☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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：)

令和8年3月30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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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）安全性生物試験研究センター 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 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）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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： ）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

（※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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： ）

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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☒	☐	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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。

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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☒	☐	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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。

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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☒ 有 ☐ 無	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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：)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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)

特になし

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

2026年 5 月 / 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

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7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7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・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 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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☒ 有 ☐ 無	☒	山梨大学	☐
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：遺伝子組み換え生物使用実験に関する基本指針)	☒ 有 ☐ 無	☒	山梨大学	☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和 8 年 5 月 8 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) 7 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 厚生労働省科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
2. 研究課題名 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) 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 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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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。

