

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

3次元培養系と次世代シーケンサーによる変異解析手法（ec-NGS）を組み合わせた化学物質
の遺伝毒性評価法の開発

令和7年度 総括研究報告書

研究代表者 戸塚 ゆ加里

令和8（2026）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

3次元培養系と次世代シーケンサーによる変異解析手法（ec-NGS）を組み合わせた化学物質の
遺伝毒性評価法の開発

戸塚 ゆ加里

1

II. 分担研究報告

1. *in vivo*評価・オルガノイド

美谷島 克宏

12

2. ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発に関する研究

戸塚 ゆ加里

15

3. ヒト肝キメラマウスを用いた*in vivo*毒性評価、HepaSH細胞の提供

樋口 裕一郎

19

4. ゲノム変異解析

長谷川 晋也

20

5. オルガノイド、MPSモデルを用いた研究の国内外動向調査

山崎 大樹

24

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

27

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

3次元培養系と次世代シーケンサーによる変異解析手法（ec-NGS）を組み合わせた化学物質の
遺伝毒性評価法の開発

研究代表者 戸塚 ゆ加里 ……………星薬科大学・教授

研究要旨

今年度は、実験動物を用いた安全性評価の 3Rs 推進とヒト外挿性の向上を目指し、マウス肝細胞由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性評価系の構築、およびヒト型代謝活性化系の導入に向けた検討を行った。

in vivo 試験および *in vitro* 試験により、肝毒性陽性对照物質を用いて肝臓に対する毒性学的影響を検討した。マウスへの反復投与による *in vivo* 試験においては、肝臓に対する種々の影響が確認されたが、それは毒性物質の作用機序により異なることが明らかとなった。一方で、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた *in vitro* 試験では肝細胞に対する直接的な影響によると考えられる各毒性物質の影響が遺伝毒性を含めて認められた。両試験系の比較から、同一毒性物質において *in vivo* および *in vitro* 評価系に共通すると考えられる毒性学的影響も観察された。*in vitro* 試験では、オルガノイド構成肝細胞に対する直接的な影響が検出され、新たな肝毒性評価系としての有用性を示す検証結果が得られているものと考えた。

初期 DNA 損傷の指標として γ -H2AX の発現を評価した結果、非遺伝毒性物質（PB）で陰性、遺伝毒性物質（EC、MCT、CMR）で陽性細胞率の増加が認められた。この結果は、同一条件で実施した小核試験の結果と整合性を示し、本評価系が化学物質の DNA 損傷評価において優れた予測能を有することが実証された。次いで、ヒト由来の代謝系を組み込んだ共培養系の構築に向け、マウス肝細胞由来オルガノイドとヒト肝キメラマウス由来の HepaSH 細胞の共培養に向けた培地条件の最適化を試みた。HepaSH においては、推奨培地である Cellatis を含む混合培地（OGM:Cellatis, 2:1 および 1:1）の使用により、主要な薬物代謝酵素（CYP1A2、2E1、3A4）の発現を 14 日間維持することが可能であった。一方、オルガノイドにおいては、Cellatis との混合培地で Hnf4a、CYP3A11、Alb といった肝成熟化マーカーの発現を増強させ、未分化な状態から成熟相への移行が促進されることが示唆されたが、OGM:Cellatis, 2:1 混合培地であれば、ある程度組織学的恒常性が維持可能であると判断した。現在、この条件下で MCT を含む被験物質の DNA 損傷性および遺伝毒性について検討を進めている。

また、ヒト肝キメラマウスへのモノクロタリン投与試験を遂行し、遺伝毒性試験における同モデルの有効性について検証を行った。

三次元培養系と次世代シーケンサーによる変異解析手法、特に error-corrected next-generation sequencing（ec-NGS）を組み合わせた化学物質の遺伝毒性評価法の開発に資するため、生体模倣システム（microphysiological systems: MPS）の活用事例および国内外の研究・規制動向を調査した。MPS は、生体内の臓器・組織の微小環境を模倣し、生理機能を再現するマイクロスケールの細胞培養プラットフォームであり、動物実験代替、ヒト外挿性の向上、ニューモダリティへの対応等の観点から、医薬品・化学物質の安全性評価における重要な new approach methodologies（NAMs）の一つとして期待されている。

今年度は、MPS World Summit 2025、EUROTOX 2025、ならびに MPS 実用化推進協議会学術シンポジウムを中心に、MPS 関連演題の動向を整理した。その結果、肝臓、消化管、腎臓、神経、心臓等を対象とした MPS・オルガノイド研究が多数報告され、特に肝臓領域では、DILI、MASH、代謝クリアランス、胆汁排泄、多臓器連結系など多様な応用が進んでいた。一方、遺伝毒性評価に MPS を直接適用した演題は限定的であり、EUROTOX 2025 では「遺伝毒性+MPS」に関する演題は確認されなかった。

具体的な先行事例として、PhysioMimix MPS を用いて、primary human hepatocytes（PHH）または HepaRG 細胞と肝類洞内皮細胞からなる肝 MPS に、ヒトリンパ芽球由来 TK6 細胞をトランズウェル上で共培養する試験系を構築していた。評価系では、肝細胞側のコメットアッセイ、TK6 細胞側の小核試験および Duplex Sequencing により、DNA 損傷、染色体異常、遺伝子変異の 3 つの遺伝毒性エンドポイントの解析が報告されていた。このように、肝 MPS は、ヒト肝代謝能を有する三次元培養環境下で、DNA 損傷、染色体異常、遺伝子変異を統合的に評価できる可能性を有しており、従来の S9 代謝活性化系や動物試験に依存した遺伝毒性評価を補完・代替する技術候補となり得る。一方で、化学物質ごとの感度差、代謝酵素活性の再現性、細胞種・ドナー差、用量反応性、長期・反復曝露条件、国際標準化に向けた妥当性確認などの課題も残されている。今後は、代表的な直接遺伝毒性物質および代謝活性化型遺伝毒性物質を用いた検証を進め、三次元培養系と ec-NGS を組み合わせたヒト外挿性の高い遺伝毒性評価法としての有用性を明確化する必要がある。

研究分担者

美谷島 克宏 東京農業大学 教授
樋口 裕一郎 実中研 室長
長谷川 晋也 星薬科大学 講師
山崎 大樹 国立医薬品食品衛生研究所 室長

研究協力者

宮崎 飛翔 日本大学大学院薬学研究科 D2
大橋 清佳 東京農業大学大学院
応用生物科学研究科 M1

A. 研究目的

化学物質の開発には安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。ヒトへの外挿性が高い試験として、トランスジェニック (TG) 動物を用いた変異原性評価が注目されているものの、現状ではヒト代謝を十分に加味した試験系とはなっていない。また、化審法などの対象となるすべての化学物質に対して、ヒトの発がん性リスクを動物実験で評価することは、昨今の動物愛護3Rs (Replacement・Reduction・Refinement) の観点からも現実的でなく、新規の動物実験代替法の開発・導入が求められている。一方、汎用されている *in vitro* 遺伝毒性試験はいずれも均質な細胞を用いての評価系であり、生体への外挿の点で限界がある。これに加え、従来の *in vitro* 遺伝毒性試験はいずれも化学物質の代謝活性化に齧歯類の代謝系 (S9) を用いており、これを単純にヒト由来のS9に変更するという手法だけでは十分にヒトの代謝を反映した結果を得ることが出来ないことに加え、ヒト由来の代謝系材料の調達にも課題がある。

このような背景から、本研究では化学物質の発がん性予測のための新規遺伝毒性評価手法として、3D培養により作成したオルガノイドを用い、ヒトへの外挿性が高くかつ迅速で簡便な *in vitro* 遺伝毒性試験の開発を試みる。多くの化学物質が肝臓に対して毒性を示すことから、本研究では肝臓を対象とした評価系の構築を検討する。

今年度は、①肝毒性物質の *in vivo* および *in vitro* における病態評価、② γ -H2AX を指標とした DNA 損傷性評価法の検討、③マウス肝オルガノイドと HepaSH 細胞の共培養条件の検討、④ヒト肝キメラマウスを用いた遺伝毒性評価法の妥当性検証、⑤ Error-Corrected NGS (ec-NGS) によるゲノム変異解析、⑥オルガノイドおよび MPS モデルを用いた研究の国内外動向調査を実施した。

B. 研究方法

① 肝毒性物質の *in vivo*・オルガノイドにおける病態評価

オルガノイドによる新規 *in vitro* 試験法の妥当性を検証するため、肝毒性陽性対照物質を用いてマウス *in vivo* 毒性試験ならびにマウス肝臓由来オルガノイドを用いた *in vitro* 評価を実施し、毒性学的影響に関するデータを取得した。

1) *in vivo* 評価

マウスへの投与期間は2、4ないし13週間とし、雄性6週齢C57BL/6Jマウスを株式会社日本エスエルシーから購入し使用した。肝毒性プロファイルを明らかにする

ため。被験物質は、*in vitro* 試験と共通にして、フェノバルビタール (PB)、カルバミン酸エチル (EC)、クマリン (CMR)、モノクロタリン (MCT)、アセトアミノフェン (APAP) をそれぞれ投与した。投与期間中は、一般状態観察、体重、摂餌量を測定し、それぞれの投与期間終了後に解剖し、採血・肝臓を摘出し、重量を測定後にサンプルとして病理組織学的検査、遺伝子発現解析を実施した。

2) *in vitro* 評価

マウス肝臓由来オルガノイドの培養を行うにあたり、C57BL/6Jマウスから採取した肝臓を3-5 mm程度に切り崩し、Tissue Dissociation Cocktail (STEMCELL Technologies) および Advanced DMEM/F-12 (Gibco) を添加して細胞ペレットを得た。得られた細胞ペレットは 40% Matrigel® (Corning, Cat. No. 356231) に希釈し、24 ウェルプレートに播種した。その後、HepatiCult™ Organoid Growth Medium (STEMCELL Technologies) の通常バージョン (Basal Medium + Antibiotics : Supplement = 95 : 5) または改変バージョン (Basal Medium + Antibiotics : Supplement = 90 : 10 + Y-27632) を添加し、肝臓オルガノイドを培養した。培養条件の詳細は、STEMCELL Technologies 社のプロトコルを参考にした。

得られた肝オルガノイドを用いてトリパンブルー染色により被験物質の細胞毒性を確認した。それにより至適濃度を設定した後、小核試験を実施した。小核試験は、培地を除去後にトリプシン (Trypsin-EDTA solution, Code 35554-64) および30% BSA (Bovine Serum Albumin 溶液, Cat. No. A8412) を含む溶液を1 mL添加し、37℃で5分間インキュベートした。その後、細胞が十分に分散するまでピペッティングを行い、5 mLチューブに回収した。続いて、Advanced DMEM/F-12 (Gibco, Cat. No. 12634-010) +30% BSAを1 mL用いてウェル内を洗浄し、先のチューブに回収した。さらに、チューブが溢れない程度までDMEM+30% BSAを加え、290 gで5分間遠心した。上清を除去後、DMEM+30% BSAを1 mL加えて再懸濁し、10 μ Lを計算盤に供して細胞数を測定した。別の5 mLチューブにDMEM+30% BSAを1 mL加え、細胞数測定結果に基づき、4 $\times$ 10⁴ cells/wellとなる量の細胞懸濁液を回収した。これを290 gで5分間遠心し、上清を除去後、先太チップを用いてマトリゲルを30 μ L/well加え、同量を各ウェル中央に播種した。CO₂ インキュベーター内で10分間インキュベート後、HepatiCult™ Organoid Growth Medium (STEMCELL Technologies) にY-27632を添加した培地 (OGM+Y) を750 μ L/well添加し、CO₂ インキュベーター内で培養した。培養3日後、培地量が800 μ L/wellとなるよう被験物質を積層した。被験物質曝露24時間後に培地を除去し、Advanced DMEM/F-12でウェル内を洗浄後、OGM+Yを750 μ L/well添加し、CO₂ インキュベーター内でさらに2日間培養した。その後、培地を除去し、トリプシン+30% BSAを1 mL添加して37℃で5分間インキュベートし、ピペッティングにより細胞を分散させた。細胞は1ウェルごとにチューブへ回収し、290 gで5分間遠心した。上清を除去後、DMEM+BSAを少量加えて再懸濁し、トリプシン処理により単一細胞化した。再度遠心後、上清を除去し、軽くタッピングした後、0.075 M塩化カリウムを1 mL添加して転倒混和した。5分間静置後、再度タッピングし、冷却したメタノール/酢酸混合液 (3 : 1) を1 mL添加して転倒混和した。1000 rpmで5分間遠心後、上清を除去し、冷却したメタノール/酢酸混合液 (99 : 1) を1 mL添加して転倒混和する操作を2回繰り返した (1

回目は遠心後に上清を除去)。最終的に細胞懸濁液をスライドガラス上に滴下して乾燥させ、ギムザ染色を行い、細胞数を計測した。

(倫理面への配慮)

マウスへの投与試験ならびにマウスからの肝臓由来のオルガノイド作製については、最少匹数の使用に留め、東京農業大学動物実験委員会承認を受けた申請内容に則り実施し、使用動物数をできる限り削減した。

② γ -H2AX を指標とした DNA 損傷性評価の検討

オルガノイドを播種し3日間培養後、陽性対照としてエチルメタンスルフォネート(EMS, 250 μ g/mL)を、被験物質としてフェノバルビタール(PB, 1000 μ M)、カルバミン酸エチル(EC, 100 mM)、モノクロタリン(MCT, 500 μ M)およびクマリン(CMR, 200 μ M)を代謝活性化系であるラットS9 mix存在下に24時間曝露し、シングルセルにして細胞を回収した。4%パラホルムアルデヒドで固定後、グリシン含有PBSおよびPBSで洗浄を行った。細胞をPBSで再懸濁させ、スライドガラスに滴下し風乾させた。次いで、0.1% TritonX-100を用いて透過処理を行い、一次抗体(Anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139) Rabbit mAb)で反応後洗浄した。次いで、二次抗体(Donkey anti rabbit IgG alexa fluor 647)で染色し再度洗浄を行った。最後にDAPIで核を染色し封入後、蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡を用いて γ -H2AX fociの形成を観察した。

③ マウス肝オルガノイドとHepaSH共培養条件の検討

HepaSH 推奨培地: Cellatis Power Primary HEP Medium(Cellatis)

オルガノイド培地: HepatiCult Organoid Growth Medium(OGM)

1. HepaSHでの培地の検討

HepaSHを播種後、培地を1:0, 2:1, 1:1, 0:1(OGM:Cellatis)で混合し1日おきに培地を交換した。培地を任意の培地に変更後1, 7, 14日目に細胞を回収した。RNAを抽出しRT-qPCRにて薬物代謝酵素であるCYP1A2, CYP2E1, CYP3A4の発現を指標に評価した。また、培地交換の際に顕微鏡下で形態変化の観察を行った。

2. オルガノイドでの検討

オルガノイドを播種後3日間OGMで培養した。その後、培地を1:0, 2:1, 1:1(OGM:Cellatis)の割合で混合した培地に交換し、1, 7, 14日目に細胞を回収した。なお、培地交換はHepaSH細胞と同様に1日おきに行った。回収した細胞からRNAを抽出し、RT-qPCR法を用いて各標的遺伝子の発現評価を行った。対象遺伝子にはHnf4a, Ttr(肝細胞マーカー)、Sox9(肝前駆細胞マーカー)、Krt19(胆管マーカー)、Alb, CYP3A11(成熟肝細胞マーカー)およびKi67(細胞増殖マーカー)を用いた。加えて、培地交換の際に顕微鏡下での形態観察を行い、培養環境の相違による細胞の経時的な変化を記録した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

④ ヒト肝キメラマウスを用いた、遺伝毒性評価法の妥当性の検証

ヒト肝キメラマウスへのモノクロタリン投与試験を遂行し、遺伝毒性試験における同モデルの有効性について検証を行った。このうち腹腔内投与群では

時間経過とともに血中肝傷害指標の上昇と、体重の減少を観察することが出来た。また星薬科大学へHepaSH細胞を計4回-25単位(55 million cells相当)頒布し、*in vitro* 共培養系の構築に貢献した。

⑤ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析

マウス由来肝前駆細胞オルガノイド(STEMCELL Technologies)を用い、*in vitro* において化学物質の曝露試験を実施した。オルガノイドは一定期間培養後、ラット由来 S9 mix を用いた代謝活性化条件下で MCT を処理した。

マウス肝臓オルガノイドにS9mix存在下で、MCTの3回曝露実験を行った。播種後3日間培養したオルガノイドへ1回目の曝露(24時間)を行い、洗浄した後に新しい培地を添加した。3日間培養した後、オルガノイドを回収し再播種を行った。3日後、2回目の曝露(24時間)を行い、洗浄後に新しい培地を添加した。6日間培養後、3回目の曝露(24時間)を行い洗浄した後、TrypLEを用いてオルガノイドを回収した。なお、MCT の培地中最終濃度は125, 500 μ M, Ethyl carbamate (EC) の最終濃度は25, 100 mM, Coumarin (CMR) の最終濃度は50 μ M, 200 μ M とした。回収したオルガノイドよりAllPrep DNA/RNA Kit(QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出し、ec-NGS(Nano-Seq)解析を行った。

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

⑥ オルガノイド、MPS モデルを用いた研究の国内外動向調査

本研究では、以下の方法により情報収集および解析を行った。

第一に、MPS World Summit 2025の演題情報を整理し、対象臓器、技術、用途、特に肝臓領域および遺伝毒性評価に関連する演題を抽出した。MPS World Summit 2025は、2025年6月9日から13日にベルギー・ブリュッセルで開催された国際MPS学会であり、MPSの研究開発および社会実装に関する最新動向を把握するための主要な情報源とした。

第二に、EUROTOX 2025におけるMPS関連情報を確認し、毒性学領域におけるMPSおよび遺伝毒性評価の接点を調査した。EUROTOX 2025は2025年9月14日から17日にギリシャ・アテネで開催されたが、遺伝毒性とMPSを直接結びつけた演題は確認されなかった。

第三に、国内動向として、MPS実用化推進協議会 第三回学術シンポジウムでの演題を整理した。同協議会は2023年8月に設立され、2026年1月21日に第3回学術シンポジウムを開催した。国内におけるMPSへの関心の高まりと、遺伝毒性評価領域での未充足領域を整理した。

第四に、遺伝毒性評価にMPSを適用した具体的事例として、Koppらの「Liver-on-chip model and application in predictive genotoxicity and mutagenicity of drugs」を精査した。本論文はMutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis誌に2024年4月11日にオンライン掲載された論文である(DOI: 10.1016/j.mrgentox.2024.503762)。

同論文では、PhysioMimix Microphysiological System (CN-Bio社)を用いて、PHHまたはHepaRG細胞、

肝臓洞内皮細胞、細胞外マトリックスからなるLiver-on-chipを構築し、トランズウェル上のTK6細胞と共培養した。評価対象物質として、直接遺伝毒性物質である methyl methanesulfonate および ethyl methanesulfonate、代謝活性化を要する cyclophosphamide および benzo[a]pyrene を用いた。評価項目は、肝細胞側のコメットアッセイ、TK6細胞側の小核試験および Duplex Sequencing であり、あわせてアルブミン産生、尿素産生、LDH放出、CYP活性およびCYP遺伝子発現を評価した。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

① 肝毒性物質の *in vivo*・オルガノイドにおける病態評価

1) *in vivo* 評価

解剖時体重は、control 群と比較し全肝毒性物質投与群において減少傾向にあった。

臓器重量では、PB 投与群と CMR 投与群において有意な増加が確認された。

血液生化学検査では、APAP 投与群、CMR 4 週投与群、MCT 2 週投与群、EC 投与群において ALT 増加傾向が確認された。

細胞毒性を評価するためトリパンブルー染色を実施し、全肝毒性物質において、濃度依存的に増加ないし増加傾向が認められた。

病理組織学的解析では、HE 染色において APAP 投与群では小葉中心性壊死、PB 投与群では小葉中心性肝細胞肥大、CMR 投与群では小葉辺縁性肝細胞肥大、MCT 投与群では 2 核細胞の増加、EC 投与群においては明らかな影響が確認されなかった

F4/80 の免疫組織化学染色 (IHC) では、EC 投与群において陽性マクロファージの増加が確認された。Caspase の IHC 染色では、APAP 投与群、PB 投与群において比較的弱い染色性が確認された。その他、肝毒性物質投与群では、明らかな影響は確認できなかった。FABP2 の IHC 染色では、CMR 投与群、MCT2w 投与群、EC 投与群において強い染色性が確認された。

遺伝子発現解析では、TNF- α は、APAP 低用量中用量投与群、CMR4 週投与群、MCT 2 週、4 週 i. p. 投与群、EC 投与群において増加傾向にあった。FABP1 は、対照群と比較して、有意な変化はなかったが、APAP 低用量と中用量、CMR2500 ppm13 週投与群、EC において増加傾向が確認された。

2) *in vitro* 評価

病理組織学的に、PB 投与群ならびに CMR 投与群では肝細胞肥大、MCT 投与群では核数の多い細胞の増加、EC 投与群では配列の乱れや核の濃染が確認された。

Caspase の IHC では、PB 投与群、MCT 投与群で染色性を確認された。FABP2 の IHC 染色では、EC 投与群では強い染色性を示し、CMR 投与群ならびに MCT 投与群において部位差はあるものの染色性が確認された。

遺伝子発現解析では、TNF- α は、APAP 高用量、MCT 低用量において増加傾向にあった。FABP1 は、PB のみで

増加傾向にあった。

小核試験では、EC 投与群、MCT 投与群、CMR 投与群において、小核数の増加ないし増加傾向が確認された。

② γ -H2AX を指標とした DNA 損傷性評価の検討
オルガノイドにポジティブコントロールとして EMS を曝露し γ -H2AX を蛍光免疫染色した結果、 γ -H2AX の発現を観察することができた (図1)。

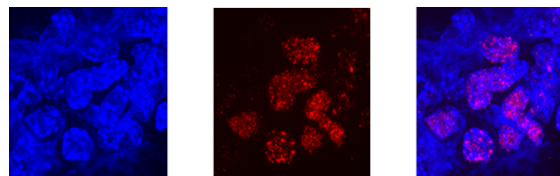


図1. EMS曝露後の γ -H2AX発現解析
(左:DAPI, 中央: γ -H2AX, 右:merge)

オルガノイドに被験物質を曝露し、蛍光免疫染色した結果を図2に示す。Control群およびPB曝露群では、DAPIによって核が明瞭に染色されている一方で、 γ -H2AXのシグナルはほとんど観察されず、DNA損傷が軽微であることが確認された。一方、EC、MCTおよびCMR曝露群では核内に γ -H2AX の発現が認められ、DNAへの影響が示唆された。特にMCT曝露群では、 γ -H2AXの強いシグナルが観察された。

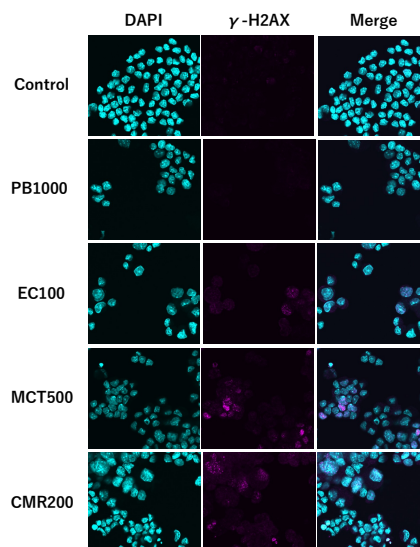


図2. 被験物質曝露後の γ -H2AX発現解析

γ -H2AX陽性細胞率の測定結果を図3に示す。非遺伝毒性発がん物質であるPBを曝露した群では、陽性細胞数の割合はコントロールと比較して顕著な変化は認められなかった。一方で、遺伝毒性発がん物質であるEC、MCTおよびCMRを曝露した群では、いずれもコントロールよりも陽性細胞の割合が増加する傾向が確認された。特にMCT曝露群では、他の被験物質と比較して陽性細胞率が高く、顕著なDNA損傷の誘発が示唆された。また、これらの結果は、観察画像の所見とも一致していた。

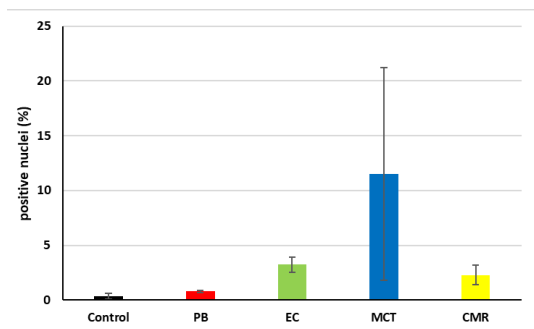


図3. 各種化学物質曝露によるオルガノイドの γ -H2AX陽性細胞率

③ マウス肝オルガノイドとHepaSH共培養条件の検討 1. HepaSHでの培地の検討

遺伝子発現解析の結果、OGM単独では7日目にはCYP3A4やCYP1A2などが低下、消失していた。Cellatisを含む培地群では14日目までCYP1A2, CYP2E1, CYP3A4すべての発現を維持することができた(図4)。形態的变化は確認されなかった(図5)。

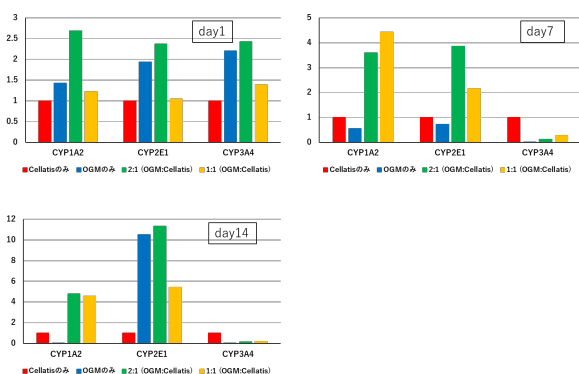


図4. HepaSH遺伝子発現解析

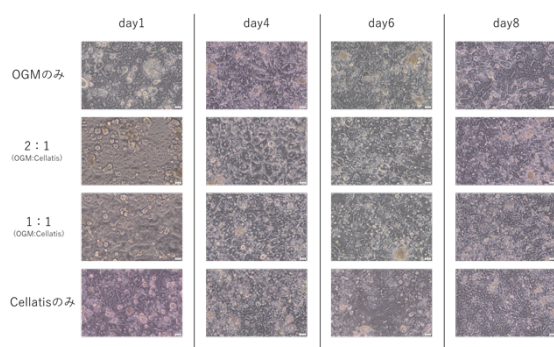


図5. HepaSH形態観察

2. オルガノイドでの検討

各種培地条件(OGMのみ、2:1混合、1:1混合)で培養したオルガノイドにおける、遺伝子発現変化を解析した結果を図6に示した。なお、day14の解析結果は、発現量が極めて高いHnf4aと、その他の指標を同一のスケールで比較することが困難であり、y軸スケールを変えた2つのグラフに分けて示した。肝細胞マーカーおよび成

熟化指標の発現は、Hnf4aが培養日数の経過とともに混合培地群(2:1および1:1)で著しく上昇し、特にday14の2:1混合群は、OGMのみの群と比較して極めて高い発現が認められた。一方、Ttrはday1では培地の違いによる発現の差はみられなかったが、day7以降はOGMのみの群と比較してやや低下する傾向が確認された。成熟肝細胞マーカーであるCYP3A11およびAlbについては、day1で混合培地群において発現上昇が認められ、day14においてもこれらの遺伝子はOGMのみの群と比較して約1.5倍から2倍程度発現していた。分化および胆管マーカーの発現に関しては、肝前駆細胞マーカーであるSOX9の発現がいずれの混合培地群においてもday7以降に減少を示し、未分化性の低下が確認された。一方で、胆管マーカーであるKrt19の発現は、混合培地群においてOGMのみの群を上回る傾向がみられた。細胞増殖能の指標となるKi67の発現をOGM群と比較したところ、day1では混合培地群においてわずかに高い値を示したものの、day7以降は減少し、OGM群より低い値を示した。各種培地条件におけるマウス肝臓オルガノイドの形態変化を顕微鏡下で観察した結果を図7に示す。播種直後(day0)では、いずれの条件においても細胞が分散した状態であった。培養7日目(day7)では、すべての群でオルガノイドの形成が進み、サイズの増大が確認された。培養14日目(day14)においては、1:1混合培地群において、一部のオルガノイドで形態が崩れ始める細胞像が確認された。

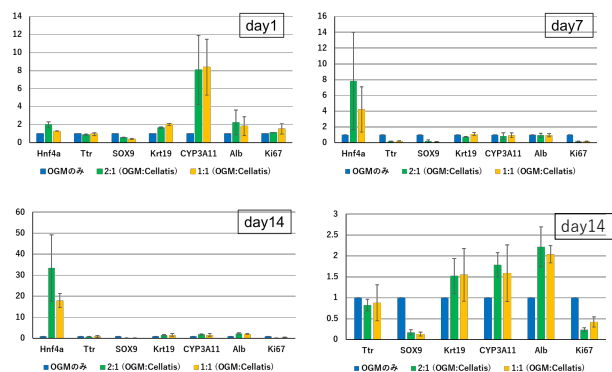


図6. オルガノイド遺伝子発現解析

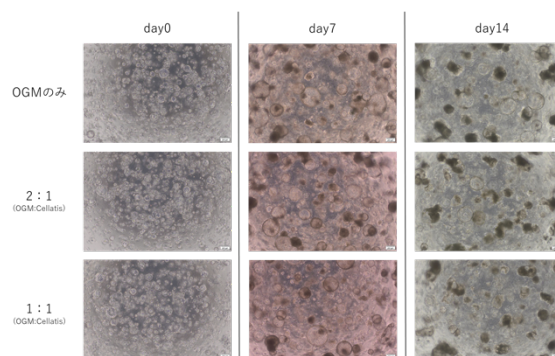


図7. オルガノイドの形態観察

④ ヒト肝キメラマウスを用いた、遺伝毒性評価法の妥当性の検証

ヒト肝キメラマウスへのモノクロタリン投与試験

を遂行し、遺伝毒性試験における同モデルの有効性について検証を行った。このうち腹腔内投与群では時間経過とともに血中肝傷害指標の上昇と、体重の減少を観察することが出来た。また星薬科大学へ HepaSH 細胞を計 4 回・25 単位 (55 million cells 相当) 頒布し、*in vitro* 共培養系の構築に貢献した。

⑤Error-Corrected NGS によるゲノム変異解析

1. マウス由来肝前駆細胞オルガノイドにおける Monocrotaline (MCT) の変異シグネチャー

マウス由来肝前駆細胞オルガノイドに対し、Monocrotaline (MCT) を 125 μ M または 500 μ M の条件で処理し、ラット S9 mix による代謝活性化条件を組み合わせた *in vitro* 曝露系を構築した。曝露後に DNA を抽出し、error-corrected NGS (NanoSeq) による変異解析を実施し、Mutational burden、および Trinucleotide mutation pattern を解析した。NanoSeq 解析の結果、MCT 処理により Mutational burden の増加が認められた。また、高濃度の MCT 処理群では C>A 変異の増加が観察された (図8)。

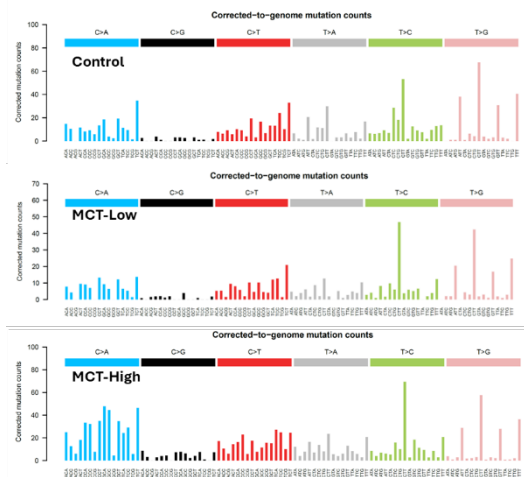


図8. オルガノイドにおける MCT の変異シグネチャー

2. マウス肝臓における MCT の変異シグネチャー

MCT を 20 mg/kg または 200 mg/kg 投与したマウス個体の肝臓を用いて NanoSeq 解析を行った。その結果、*in vitro* オルガノイド系と同様に、MCT 投与群において C>A 変異の増加が認められた (図9)。この増加は投与量依存的であり、高用量群 (200 mg/kg) でより顕著であった。

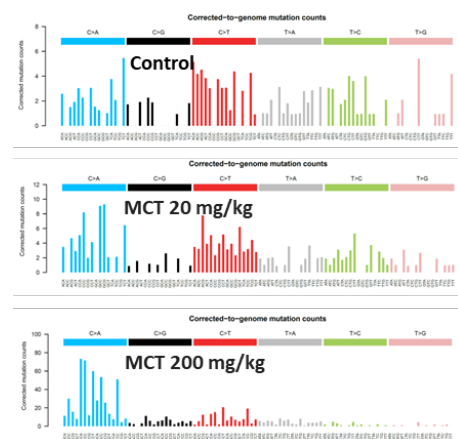


図9. マウス肝臓における MCT の変異シグネチャー

3. MCT の変異シグネチャー解析

変異シグネチャーの抽出を行った結果、MCT 処理条件下で増加する SBS96B と、対照群にも認められる SBS96A が同定された。SBS96B は MCT 濃度依存的に増加しており、MCT 処理により誘導される変異成分である可能性が高い。一方、SBS96A は培養条件等に由来する背景シグネチャーであると考えられた (図10、上)。さらに、SBS288 系列の解析では、MCT 処理により SBS288B が増加し、このシグネチャーにおいて C>A 変異が転写鎖側に偏って増加する strand bias が認められた (図10、下)。この結果は、MCT による DNA 損傷形成および修復過程が転写活性と関連している可能性を示唆するものである。

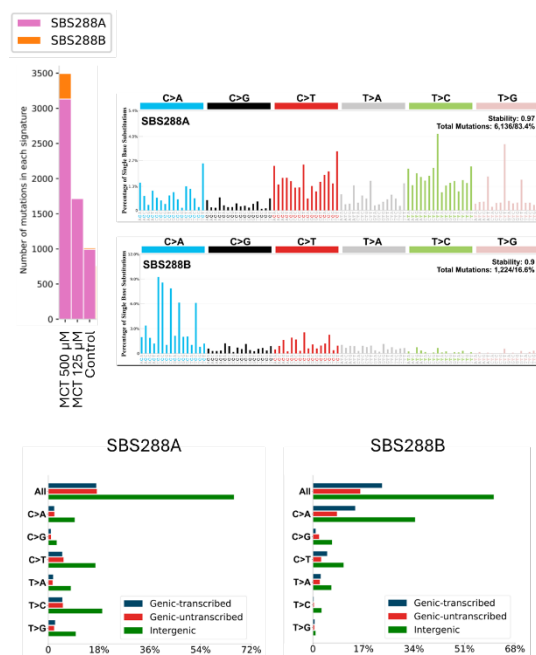


図10. MCT の変異シグネチャー解析

4. マウス由来肝前駆細胞オルガノイドにおける Ethyl carbamate (EC) の変異シグネチャー

EC について、マウス由来肝前駆細胞オルガノイドを用いて低用量および高用量条件で処理し、同様に NanoSeq 解析を実施した。その結果、EC 処理オルガノイドでは、変異頻度は対照群と同程度であり、明確な増加は

認められなかった（図11）。

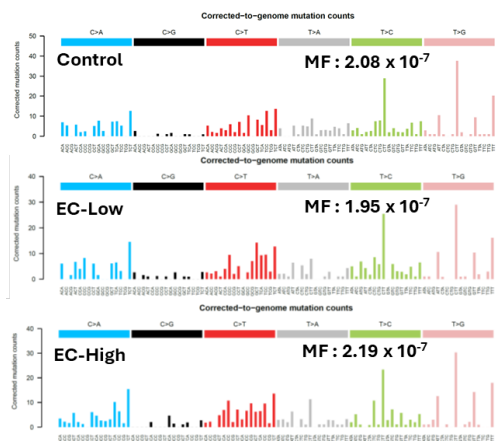


図11. オルガノイドにおける EC の変異シグネチャー
5. マウス肝臓における EC の変異シグネチャー

一方、EC を投与したマウス個体の肝臓では、対照群と比較して変異頻度の顕著な増加が認められた。Trinucleotides mutation pattern では、T>A を中心とした塩基置換の増加が観察された。抽出された変異シグネチャーは MCT 由来の SBS 構成とは異なり、EC 特有の変異導入機構を反映している可能性が示唆された。さらに、ストランドバイアス解析の結果、EC 投与マウス肝臓においては、T>A や T>C の塩基置換において 転写鎖と非転写鎖の間で非対称な分布が認められた（図12）。この結果は、EC が *in vivo* 条件下で DNA 付加体形成により変異導入が生じている可能性を示唆するものである。

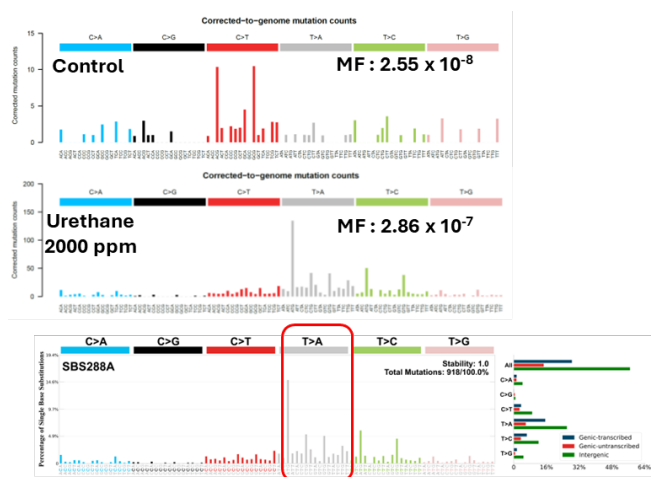


図12. マウス肝臓における EC の変異シグネチャー

6. オルガノイドにおける Coumarin の変異シグネチャー

マウス由来肝前駆細胞オルガノイドに低用量および高用量条件で処理し、NanoSeq による変異解析を行った。その結果、mutation frequency は対照群と同程度であり、用量依存的な増加は認められなかった。Trinucleotides mutation pattern においても、特定の塩基置換の増加は観察されず、全体として対照群と類似した変異パターンを示した（図13）。

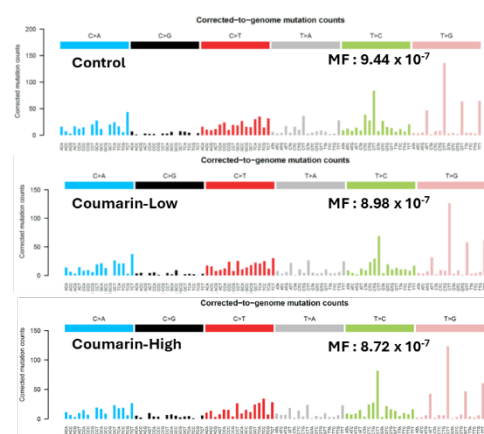


図13. オルガノイドにおける Coumarin の変異シグネチャー

7. マウス肝臓における Coumarin の変異シグネチャー

同様に、クマリンを投与したマウス個体の肝臓においても、変異頻度および変異スペクトラムに顕著な変化は認められなかった（図14）。

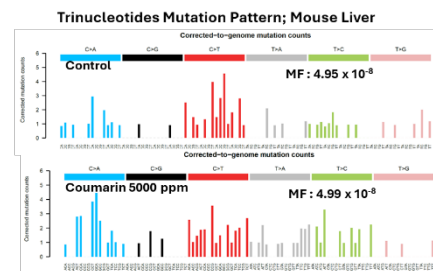


図14. マウス肝臓における Coumarin の変異シグネチャー

⑥オルガノイド、MPSモデルを用いた研究の国内外動向調査

1. MPSを取り巻く国際的動向

MPSは、創薬および化学物質安全性評価において、動物実験代替およびヒト外挿性向上のための重要な技術として位置づけられつつある。一般的に、MPSは「生体内の臓器や組織の微小環境を模倣し、その生理的機能を再現するマイクロスケールの細胞培養プラットフォーム」と整理されており、従来の二次元培養、三次元オルガノイド、MPS、多臓器連結モデルへと発展する技術体系の中に位置づけられている。

米国では、FDA Modernization Act 2.0により、非臨床試験において細胞ベースアッセイ、臓器チップ・MPS、コンピューターモデリング等の非動物代替法が利用可能な選択肢として明確化された。FDAは2025年4月10日に、モノクローナル抗体等の薬剤開発における動物試験要件を段階的に削減・代替する方針を発表し、AIベースの毒性予測、細胞株、オルガノイド等を含むNAMsの活用を促進するとした。NIHも2025年4月29日に、ヒトベース研究技術を優先し、動物使用を削減する新たな方針を発表している。

MPS World Summit 2025の演題解析(図15)では、肝臓、消化管、腎臓、神経、心臓、血管など多様な臓器を対象としたMPS・オルガノイド研究が確認された。特に肝臓領域では、DILI、MASH、脂質ナノ粒子毒性、代謝クリアランス、胆汁排泄、肝・腸連結、肝・腎連結、肝・神経・筋肉連結など、医薬品・化学物質評価に関連する応用が広がっていた(図16)。肝臓関連演題の中に「肝-変異原性予測-PhysioMimix」および「New approach method for predictive genotoxicity using a microphysiological system」という遺伝毒性関連事例が確認された。

臟器別演題數

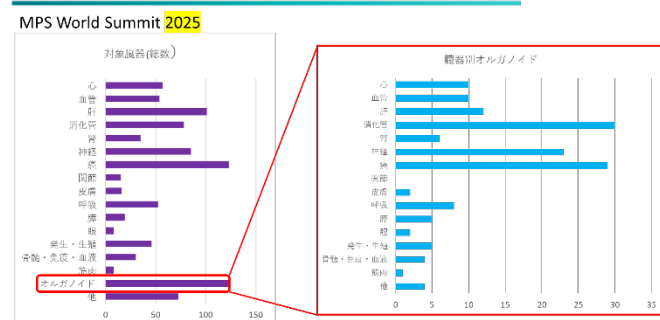


図 15 MPS World Summit 2025 の演題分析結果

[illegible]

図 16 MPS World Summit 2025 での肝臓に関する演題
の詳細

MPS実用化推進協議会では、2023年8月の設立以降、学術シンポジウム等を通じて産官学連携の場が形成されている。会員数は2023年7月時点の149から2026年1月時点で459へ増加し、製薬企業、CRO、食品企業、実験機器メーカー、試薬・化学メーカー、細胞製造・販売メーカー、大学、政府・国立研究所など、多様なステークホルダーが参加している。第3回学術シンポジウムでは参加

Koppらの論文では、肝MPSを用いて、代謝能を有するヒト肝環境とTK6細胞を組み合わせ、複数の遺伝毒性エンドポイントを同時に評価する試験系が構築された。肝細胞としてPHHまたはHepaRG細胞を用い、肝類洞内皮細胞および細胞外マトリックスを組み合わせたディスクをMPS-T12プレート上で培養した。TK6細胞はトランズウェル上に配置され、肝MPSとの相互作用が可能な構成とされた。

この試験系では、アルブミン産生、尿素産生、LDH放出、CYP活性およびCYP遺伝子発現により、細胞の健康状態および代謝能が評価された。未処置条件下では、HepaRGおよびPHHのいずれのLOCにおいても細胞機能が維持され、CYP遺伝子発現および一部CYP活性が確認された。PHHとHepaRGでは、アルブミン産生、尿素産生、CYP発現・活性に差が認められ、細胞種の違いが代謝活性および遺伝毒性応答に影響し得ることが示唆された。

小核試験では、PHH-LOCおよびHepaRG-LOCの双方において、cyclophosphamide、methyl methanesulfonateおよびethyl methanesulfonateによる遺伝毒性が検出された。一方、benzo[a]pyreneについては、小核頻度の明確な上昇は認められなかった。コメントアッセイでは、benzo[a]pyrene、methyl methanesulfonateおよびethyl methanesulfonateによるDNA損傷が検出されたが、cyclophosphamideでは明確な%Tail DNA増加は確認されなかった。Duplex Sequencingでは、methyl methanesulfonateおよびethyl methanesulfonateによる変異頻度上昇が確認され、cyclophosphamideについても変異頻度上昇が認められた一方、benzo[a]pyreneの遺伝毒性は変異スペクトラム上では明確に検出されなかった。

遺伝毒性+MPS論文の紹介

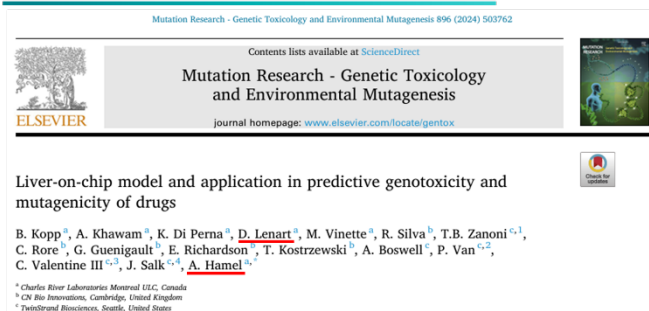


図 17 遺伝毒性および MPS 論文の紹介

D. 考察

本研究では、複数の肝毒性物質を用いて *in vivo* および *in vitro* における毒性変化を比較検討した。解剖時体重は全肝毒性物質投与群において減少傾向を示し、全身性の負荷が生じていた可能性が示唆された。一方で、PB 投与群および CMR 投与群では臓器重量の有意な増加が認められ、病理組織学的にも肝細胞肥大が確認されたことから、これらの肝重量増加は酵素誘導や代謝適応に伴う肥大性変化に起因すると考えられた。

血液生化学検査では、APAP、CMR、MCT、EC 投与群で ALT の増加傾向が認められ、肝細胞障害の発現が示唆された。特に APAP は小葉中心性壊死を呈しており、既知の肝毒性機序と一致する結果であった。

トリパンブルー染色による細胞毒性評価では、全物質で濃度依存的な細胞死の増加が認められ、*in vitro* 系においても肝毒性を捉えられることが示唆された。

病理組織学的解析では、*in vivo* において APAP で小葉中心性壊死、PB および CMR で肝細胞肥大、MCT で 2 核細胞の増加が確認された。*in vitro* においても PB および CMR で肥大、MCT で核数の多い細胞の増加が認められ、形態学的変化の再現性が示唆された。一方、EC 投与群では *in vivo* で明らかな形態変化は認められなかったが、*in vitro* では配列の乱れや核濃染が観察されており、培養系特有の感受性や評価指標の差が影響した可能性が考えられた。

免疫組織学的解析では、EC 投与群において F4/80 陽性マクロファージの増加が確認され、炎症反応の関与が示唆された。TNF- α 遺伝子発現も複数群で増加傾向を示しており、肝障害に伴う炎症応答の誘導が示された。Caspase 染色では一部群で弱い陽性が認められたものの顕著ではなく、壊死主体の毒性機序が関与している可能性が考えられる。また、FABP2 および FABP1 の発現変動から、CMR、MCT、EC において脂質代謝異常の関与が示唆され、*in vitro* においても類似した染色性が確認されたことから、脂質関連毒性の再現性が示された。

染色体異常の検出を目的とした小核試験では、EC、MCT、CMR 投与群で増加ないし増加傾向が認められ、これら物質が染色体異常を有することによる遺伝毒性リスクが示唆された。

全体を通し、本分担研究で用いた *in vitro* 系は、肝細胞肥大や多核化などの構造的変化および一部の分子応答を *in vivo* と同様の傾向で再現し得ることが示された。一方で、全身性要因に依存する反応は完全には再現されず、本評価系の限界も明らかとなった。

以上の検討より、肝臓オルガノイドを用いた *in vitro* 毒性試験法が既存の *in vivo* 肝毒性試験を一定程度は補完し得る評価手法であることが示された。動物実験代替法として発展させるため、さらなる検証が重要と考えられた。

② γ -H2AX を指標とした DNA 損傷性評価の検討

DNA 二本鎖切断の指標である γ -H2AX の発現を評価した結果、EMS の曝露により明確な γ -H2AX foci が確認され、マウス肝臓由来オルガノイドを用いて γ -H2AX 発現解析が可能であることが示唆された。非遺伝毒性発がん物質である PB 曝露群においては陽性細胞率の上昇が認められなかったが、遺伝毒性発がん物質である EC、MCT および CMR 曝露群では、いずれも陽性細胞率が増加傾向を示した。この結果は、以前我々が同一のオルガノイドおよび曝露条件（化学物質・濃度）を用いて実施した小核試験の結果と同様の傾向であり、先行データとの整合性が確認された。このことから、本評価系が化学物質による初期 DNA 損傷を正確に捉えているだけでなく、その損傷がその後の染色体異常（小核形成）へと繋

がることも考えられた。さらに、従来の遺伝毒性試験を補完できるだけでなく、迅速なスクリーニング指標となり得ることも示唆された。

③ マウス肝オルガノイドと HepaSH 共培養条件の検討
マウス肝オルガノイドと HepaSH 共培養条件の検討結果より、HepaSH 細胞は OGM 単独では 7 日目には CYP3A4 や CYP1A2 などが消失、低下していた。Cellatis を含む培地群では 14 日目まで CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4 すべての発現を維持することができた。そのため、HepaSH の薬物代謝酵素を長期的に維持するには 2:1 (OGM:Cellatis) あるいは 1:1 (OGM:Cellatis) の培地で培養することが妥当であると判断した。オルガノイドでは、混合培地群（2:1 および 1:1）で肝細胞マーカーである Hnf4a ならびに成熟肝細胞マーカーである CYP3A11 や Alb の発現が増強されたことは、Cellatis 培地の添加がオルガノイドの成熟化を促進したことが示唆された。これに並行して、肝前駆細胞マーカーである SOX9 の減少と増殖指標である Ki67 の低下が認められた。これらのことから、成熟化の進行に伴い細胞増殖が抑制されたと考えられる。一方、形態観察の結果、1:1 混合培地群では day14 において一部のオルガノイドで形態の崩壊が認められた。この現象は、Cellatis 成分の濃度が過剰となり、オルガノイドの恒常性維持に負荷が生じた結果であると推察される。以上の結果から、共培養条件には 2:1 (OGM:Cellatis) の混合比率が妥当であると考えられる。

④ ヒト肝キメラマウスを用いた、遺伝毒性評価法の妥当性の検証

モノクロタリンを投与したヒト肝キメラマウスにおいて、肝傷害の誘導を期待できる兆候が得られている。今後は投与個体より採取したキメラ肝臓の病理解析、並びに ec-NGS 解析を進め、評価系としての同モデルの妥当性を検証する必要がある。

⑤ Error-Corrected NGS によるゲノム変異解析

本研究では、マウス由来肝前駆細胞オルガノイドおよびマウス個体を用いて ec-NGS (NanoSeq) 解析を行い MC に特異的な変異シグネチャーを検出した。一方で、EC の解析結果に示されるように、*in vivo* 条件では明確な変異誘導が観察されるにもかかわらず、オルガノイド系では同様の変異シグネチャーが検出されなかった。

この *in vitro-in vivo* 間の差異の一因として、オルガノイドにおける化学物質の曝露時間が相対的に短いことが影響している可能性が考えられる。本研究で用いたオルガノイド条件では、細胞生存性や培養維持を考慮し、比較的短期間の曝露時間を採用した。しかし、変異シグネチャーの形成は、DNA 損傷の蓄積、修復過程の反復、さらには細胞分裂を介した変異の固定化といった時間依存的プロセスを必要とするため、曝露時間が不十分な場合には変異導入が検出限界に達しない可能性がある。

したがって、今後はオルガノイドを用いた遺伝毒性評価において、曝露時間を延長した条件設定や、反復曝露の回数を検討する実験系の構築が重要になると考えられる。例えば、低濃度条件での長時間曝露や、培養時間の短縮により細胞毒性を抑制しつつ、変異蓄積を評価できる可能性がある。

⑥オルガノイド、MPS モデルを用いた研究の国内外動向調査

本調査により、MPS は、ヒト細胞を用いた三次元的かつ動的な培養環境を提供することで、従来の二次元培養系では再現困難であった肝代謝能、細胞間相互作用、長期曝露条件を評価系に組み込める可能性が示された。特に遺伝毒性評価では、代謝活性化を要する化学物質の評価が重要であり、肝 MPS は S9 代謝活性化系の限界を補完するヒト関連性の高い試験系となり得る。

Kopp らの Liver-on-chip 事例は、同一の MPS システム上で、DNA 損傷、染色体異常、遺伝子変異という遺伝毒性評価に必要な複数エンドポイントを組み合わせることで、従来のレポーター遺伝子や選択培養に依存せず、低頻度の塩基置換変異を高感度に検出できる可能性が示された。この点は、本研究課題で目指す三次元培養系と ec-NGS を組み合わせた遺伝毒性評価法の開発方針と整合する。

一方で、同試験系には課題も認められた。benzo[a]pyrene ではコメットアッセイで陽性応答が認められたものの、小核試験および Duplex Sequencing では明確な陽性応答が得られず、代謝活性化物質に対する検出感度は化合物およびエンドポイントにより異なる可能性が示された。また、CYP 活性、特に cyclophosphamide の代謝に関与する CYP2B6 活性の検出性、PHH と HepaRG の機能差、曝露濃度、曝露期間、細胞生存率、DNA 修復能、用量反応性など、試験条件の最適化が必要である。

今後、MPS を遺伝毒性評価法として一般化し、将来的な国際標準化や OECD テストガイドライン化を目指すためには、代表的な直接遺伝毒性物質、代謝活性化型遺伝毒性物質、非遺伝毒性物質を含む標準化合物パネルを用いた多施設検証が必要である。また、MPS で得られた結果を、既存の *in vitro* 試験、*in vivo* 試験、ヒト肝キメラマウス等の代謝能を有する動物モデルの結果と比較し、感度、特異度、再現性、ヒト外挿性を評価する必要がある。本研究では、MPS World Summit 等の演題分析結果を研究へ還元し、一般化・国際標準化を経て、将来的に OECD テストガイドライン化を目指す。

E. 結論

本研究では、肝臓を標的とした次世代型遺伝毒性・肝毒性評価法の開発を目的として、マウス肝臓由来オルガノイド、ヒト肝細胞株 HepaSH、*in vivo* マウス試験、ec-NGS (NanoSeq) 解析、ならびに肝 MPS の活用可能性について検討した。

まず、*in vivo* 試験および *in vitro* 試験による肝毒性評価では、肝毒性陽性対照物質に対する応答が、各物質の作用機序に応じて異なることが明らかとなった。*in vivo* 試験では、肝組織の形態学的変化や炎症応答など、生体内代謝や免疫応答を含む複合的な毒性影響を評価できた。一方、*in vitro* 試験では、オルガノイド構成肝細胞に対する直接的な影響が明瞭に検出され、新たな肝毒性評価系としての有用性が示された。

マウス肝臓由来オルガノイドを用いた γ -H2AX 発現解析では、EMS による DNA 損傷を高感度に検出できることが確認された。被験物質を用いた検討では、非遺伝

毒性物質である Phenobarbital (PB) は陰性を示した一方、遺伝毒性物質である Ethyl carbamate (EC)、Monocrotaline (MCT) および Coumarin (CMR) では陽性細胞率の増加傾向が認められた。これらの結果は、先行する小核試験データとも整合しており、本評価系が従来の遺伝毒性試験を補完するだけでなく、迅速なスクリーニング指標として有用である可能性を示した。

また、HepaSH との共培養に向けた培地条件の検討では、Cellatis を含む混合培地により、HepaSH における薬物代謝酵素 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4 の発現維持が確認された。さらに、オルガノイドでは肝成熟化マーカーである Hnf4a、Alb、CYP3A11 の発現増強が認められた。形態保持能を考慮した結果、1:1 混合培地では長期培養時にオルガノイド構造の崩壊がみられたため、組織学的恒常性を維持できる 2:1 (OGM:Cellatis) 混合培地が至適条件と判断された。現在、この条件下で MCT などの被験物質を用いた DNA 損傷性および遺伝毒性評価が進められている。

さらに、ヒト肝キメラマウスを用いた遺伝毒性試験についても解析を進めており、次年度以降は候補薬物の選定や評価方法の見直しを行う予定である。あわせて、HepaSH 細胞の提供体制についても、必要に応じて柔軟に対応できるよう準備を進めている。

ec-NGS 解析では、MCT 曝露により、オルガノイドおよびマウス肝臓の双方で C>A 変異の増加を伴う特徴的な変異シグネチャーが検出され、*in vitro* と *in vivo* の間に対応する変異誘導が確認された。一方、EC では、マウス肝臓において明確な変異頻度の増加が認められたが、オルガノイド系では同様の変異誘導は検出されなかった。また、Coumarin では、オルガノイドおよびマウス肝臓のいずれにおいても変異頻度の増加は認められなかった。EC における *in vitro* と *in vivo* の差異については、オルガノイド条件での曝露時間や反復曝露回数が十分でなかった可能性が考えられ、変異シグネチャー形成には曝露条件、とくに曝露時間が重要であることが示唆された。

以上より、肝 MPS と ec-NGS を組み合わせた遺伝毒性評価法は、ヒト代謝を考慮した新しい NAM (New Approach Methodologies) として有望であると考えられる。現時点では、遺伝毒性評価への MPS 応用例はまだ限定的であり、技術的課題や標準化上の課題も残されている。しかし、国内外における規制動向や MPS 研究の進展を踏まえると、本領域の重要性は今後さらに高まると考えられる。本研究で得られた知見は、三次元培養系と ec-NGS を組み合わせた次世代型遺伝毒性評価法の開発に向けた基盤情報となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishigamori R., Ohno A., Fukuhara K., Hasegawa S., **Totsuka Y***, Genotoxicity Assessment of Mesoporous Silica and Graphene Oxide in GDL1 Cells, Genes & Environ., 2025 48 (1): 2.
2. Betsuyaku Y., Motohashi M., Sassa A., Takamura-Enya T., **Totsuka Y***, Analysis of Novel DNA Adducts Derived from Acetaldehyde, Biomolecules. 2025 15 (6): 878.
3. Ando Y., Takeshima H., **Hasegawa S.**, Watanabe C., Hara-Kudo Y., Oku T. Dual regulation of coronin-1 expression by the core promoter and intronic regions. J

2. 学会発表

1. 戸塚 ゆ加里 正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発、第52回日本毒性学会 (2025年7月、那覇、沖縄)
2. 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚 ゆ加里、末水洋志、In vitro薬剤誘発性リン脂質症評価におけるHepaSH細胞の有用性、第52回日本毒性学会 (2025年7月、那覇、沖縄)
3. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、加藤 孝一、美谷島 克宏、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 毒性試験法の開発、第38回発癌病理研究会 (2025年8月、九十九里、千葉)
4. Yukari Totsuka¹, Momoko Nagai², Asmaa Elzawahari², Rikako Ishigamori¹, Shinya Hasegawa¹, Mamoru Kato, Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, EMGS2025 (2025年9月、ニューヨーク、米国)
5. 戸塚 ゆ加里 環境発がん因子の解明に向けた変異シグネチャーとDNA付加体の解析、第32回がん予防大会 (2025年9月、名古屋、愛知)
6. 小池遙己、小高和大、渋谷優空、関根 航、茅野朋子、松本真理子、藤岡正喜、鈴木周五、魏民、戸塚 ゆ加里、有機フッ素化合物 (PFAS) の遺伝毒性評価第32回がん予防大会 (2025年9月、名古屋、愛知)
7. Yukari Totsuka, Comprehensive Insights into Environmental Carcinogenesis via DNA Adducts and Genome-wide Mutation Profiling, 第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
8. 石ケ守 里加子、大野 彰子、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの遺伝毒性評価、第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
9. 長谷川 晋也、渡部 光一、川口 駿、垣内 伸之、小川 誠司、吉田 健一、戸塚 ゆ加里、加熱タバコ製品の吸入曝露による遺伝毒性と変異スペクトラム、第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
10. Yukari Totsuka, Decoding Environmental Carcinogenesis for Cancer Prevention: Insights from DNA Adduct and Mutation Profiling, 2025 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (2025年10月、ソウル、韓国)
11. 戸塚 ゆ加里、環境要因によるDNA付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索とメカニズムの解明、第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2025年10月、大阪)
12. 戸塚 ゆ加里、次世代シーケンサー (NGS) とアダクトーム解析を用いた遺伝毒性物質の探索と発がんメカニズムに関する研究、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 学会賞受賞講演 (2025年11月、静岡)
13. 石ケ守 里加子、大野 彰子、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの包括的毒性評価、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
14. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、加藤 孝一、美谷島 克宏、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性試験法の開発、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
15. 長谷川 晋也、石ケ守 里加子、大野 麻理奈、吉田 健一、垣内 伸之、渡部 光一、川口 駿、小川 誠司、戸塚 ゆ加里、ヒト胎児腎臓細胞株である 293 FT 細胞を用いたError-corrected NGSによる化学物質の変異シグネチャー解析、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
16. 戸塚 ゆ加里、オルガノイド技術を用いた環境化学物質影響評価、日本学術会議主催学術フォーラム (2025年12月、六本木、東京)
17. 戸塚 ゆ加里、ヒトへの外挿性を考慮した新規 *in vivo* 代替型遺伝毒性評価法の開発、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
18. 小畑 悠樹、上原 正太郎、樋口 裕一郎、戸塚 ゆ加里、末水 洋志、ヒト肝キメラマウスにおけるメトトレキサートの代謝および腎毒性、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
19. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、吉田 健一、大野 麻理奈、小川 誠司、垣内 伸之、川口 駿、渡部 光一、中馬 新一郎、加藤 孝一、美谷島 克宏、樋口 裕一郎、上原 正太郎、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 遺伝毒性試験法の開発、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
20. 長谷川 晋也、石ケ守 里加子、高橋 賢吾、遠藤 瑞葵、戸塚 ゆ加里、ヒト胎児腎臓細胞株を用いたDNA損傷を指標とした化学物質の変異原性の評価、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
21. 今井 正彦、小川 心音、川西 なつき、中山 瑞穂、大島 正伸、戸塚 ゆ加里、大腸がんモデルオルガノイドを用いた化学物質のプロモーション活性評価法の構築、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
22. 1) 大橋 清佳、天田 佳秀、煙山 紀子、前川 竜也、戸塚 ゆ加里、美谷島 克宏、肝毒性物質の投与によるマウス肝臓における FABP 発現の変動に関する解析、第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、ウイंक あいち (愛知県産業労働センター) 2026 年 1 月 23 日
23. Yamazaki D, Horiuchi S, Ikeda Y, Shinha K, Koda N, Masuo Y, Kimura H, Kato Y. Evaluation of drug-induced cardiotoxicity via hepatic metabolism in a perfusing liver-heart microphysiological system. EUROTOX2025, 2025/9, ポスター発表

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

3次元培養系と次世代シーケンサーによる
変異解析手法（ec-NGS）を組み合わせた化学物質の遺伝毒性評価法の開発
分担研究項目：in vivo評価・オルガノイド

研究分担者 美谷島 克宏 ……………東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究要旨：

本研究では、in vivo試験および in vitro試験により、肝毒性陽性対照物質を用いて肝臓に対する毒性学的影響を検討した。マウスへの反復投与による in vivo試験においては、肝臓に対する種々の影響が確認されたが、それは毒性物質の作用機序により異なることが明らかとなった。一方で、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた in vitro試験では肝細胞に対する直接的な影響によると考えられる各毒性物質の影響が遺伝毒性を含めて認められた。両試験系の比較から、同一毒性物質において in vivoおよび in vitro評価系に共通すると考えられる毒性学的影響も観察された。in vitro試験では、オルガノイド構成肝細胞に対する直接的な影響が検出され、新たな肝毒性評価系としての有用性を示す検証結果が得られているものと考えた。

A. 研究目的

化学物質や医薬品の安全性評価において、肝毒性の評価は重要である。肝臓は生体内における主要な代謝・解毒臓器であり、多くの外来性化学物質の影響を受けやすく、肝障害の予測および早期検出は、医薬品開発や化学物質管理において不可欠である。

従来、肝毒性の評価には実験動物を用いた in vivo試験が広く用いられてきた。これらの試験は生体反応を包括的に評価できるという利点を有する一方で、動物実験削減の国際的要請が喫緊の課題となっており、近年 in vitro試験や New Approach Methodologies (NAMs)の開発および導入が進められている。

本分担研究では、新たな in vitro評価系として、自己組織化能を有し肝機能を保持している肝オルガノイドを用いて毒性評価系の確立を目指している。その毒性評価の妥当性については、既存の in vivo試験で得られた結果との比較検証を進めるため、マウス肝臓由来オルガノイドを用い、既知の肝毒性物質を曝露した際の変化を評価し、従来の in vivo試験の結果と対応検討することで、肝オルガノイドを用いた新規毒性評価系としての有用性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

分担研究者として、美谷島はオルガノイドによる新規 in vitro試験法の妥当性を検証するため、肝毒性陽性対照物質を用いてマウス in vivo毒性試験ならびにマウス肝臓由来オルガノイドを用いた in vitro評価を実施し、毒性学的影響に関するデータを取得した。

1) in vivo評価

マウスへの投与期間は2、4ないし13週間とし、雄性6週齢C57BL/6Jマウスを株式会社日本エスエルシーから購入し使用した。肝毒性プロファイルを明らかにするため、被験物質は、in vitro試験と共通にして、フェノバルビタール(PB)、カルバミン酸エチル(EC)、クマリン

(CMR)、モノクロタリン(MCT)、アセトアミノフェン(APAP)をそれぞれ投与した。投与期間中は、一般状態観察、体重、摂餌量を測定し、それぞれの投与期間終了後に解剖し、採血・肝臓を摘出し、重量を測定後にサンプルとして病理組織学的検査、遺伝子発現解析を実施した。

2) in vitro評価

マウス肝臓由来オルガノイドの培養を行うにあたり、C57BL/6Jマウスから採取した肝臓を3-5 mm程度に切り崩し、Tissue Dissociation Cocktail (STEMCELL Technologies) および Advanced DMEM/F-12 (Gibco) を添加して細胞ペレットを得た。得られた細胞ペレットは 40% Matrigel® (Corning, Cat. No. 356231) に希釈し、24 ウェルプレートに播種した。その後、HepatiCult™ Organoid Growth Medium (STEMCELL Technologies) の通常バージョン (Basal Medium + Antibiotics : Supplement = 95 : 5) または改変バージョン (Basal Medium + Antibiotics : Supplement = 90 : 10 + Y-27632) を添加し、肝臓オルガノイドを培養した。培養条件の詳細は、STEMCELL Technologies 社のプロトコルを参考にした。

得られた肝オルガノイドを用いてトリパンブルー染色により被験物質の細胞毒性を確認した。それにより至適濃度を設定した後、小核試験を実施した。小核試験は、培地を除去後にトリプシン (Trypsin-EDTA solution, Code 35554-64) および30% BSA (Bovine Serum Albumin 溶液, Cat. No. A8412) を含む溶液を1 mL添加し、37℃で5分間インキュベートした。その後、細胞が十分に分散するまでピペッティングを行い、5 mLチューブに回収した。続いて、Advanced DMEM/F-12 (Gibco, Cat. No. 12634-010) +30% BSAを1 mL用いてウェル内を洗浄し、先のチューブに回収した。さらに、チューブが溢れない程度までDMEM+30% BSAを加え、290 gで5分間遠心した。上清を除去後、DMEM+30% BSAを1 mL加え

て再懸濁し、10 μ Lを計算盤に供して細胞数を測定した。別の5 mLチューブにDMEM+30% BSAを1 mL加え、細胞数測定結果に基づき、4 $\times$ 10⁴ cells/wellとなる量の細胞懸濁液を回収した。これを290 gで5分間遠心し、上清を除去後、先太チップを用いてマトリゲルを30 μ L/well加え、同量を各ウェル中央に播種した。CO₂インキュベーター内で10分間インキュベート後、HepatiCult™ Organoid Growth Medium (STEMCELL Technologies) にY-27632を添加した培地 (OGM+Y) を750 μ L/well添加し、CO₂インキュベーター内で培養した。培養3日後、培地量が800 μ L/wellとなるよう被験物質を積層した。被験物質曝露24時間後に培地を除去し、Advanced DMEM/F-12でウェル内を洗浄後、OGM+Yを750 μ L/well添加し、CO₂インキュベーター内でさらに2日間培養した。その後、培地を除去し、トリプシン+30% BSAを1 mL添加して37°Cで5分間インキュベートし、ピペティングにより細胞を分散させた。細胞は1ウェルごとにチューブへ回収し、290 gで5分間遠心した。上清を除去後、DMEM+BSAを少量加えて再懸濁し、トリプシン処理により単一細胞化した。再度遠心後、上清を除去し、軽くタッピングした後、0.075 M塩化カリウムを1 mL添加して転倒混和した。5分間静置後、再度タッピングし、冷却したメタノール/酢酸混合液 (3:1) を1 mL添加して転倒混和した。1000 rpmで5分間遠心後、上清を除去し、冷却したメタノール/酢酸混合液 (99:1) を1 mL添加して転倒混和する操作を2回繰り返した (1回目は遠心後に上清を除去)。最終的に細胞懸濁液をスライドガラス上に滴下して乾燥させ、ギムザ染色を行い、細胞数を計測した。

(倫理面への配慮)

マウスへの投与試験ならびにマウスからの肝臓由来のオルガノイド作製については、最少匹数の使用に留め、東京農業大学動物実験委員会承認を受けた申請内容に則り実施し、使用動物数をできる限り削減した。

C. 研究結果

1) *in vivo*評価

解剖時体重は、control群と比較し全肝毒性物質投与群において減少傾向にあった。

臓器重量では、PB投与群とCMR投与群において有意な増加が確認された。

血液生化学検査では、APAP投与群、CMR 4週投与群、MCT 2週投与群、EC投与群においてALT増加傾向が確認された。

細胞毒性を評価するためトリパンブルー染色を実施し、全肝毒性物質において、濃度依存的に増加ないし増加傾向が認められた。

病理組織学的解析では、HE染色においてAPAP投与群では小葉中心性壊死、PB投与群では小葉中心性肝細胞肥大、CMR投与群では小葉辺縁性肝細胞肥大、MCT投与群では2核細胞の増加、EC投与群においては明らかな影響が確認されなかった。

F4/80の免疫組織化学染色 (IHC) では、EC投与群において陽性マクロファージの増加が確認された。CaspaseのIHC染色では、APAP投与群、PB投与群において比較的弱い染色性が確認された。その他、肝毒性物質投与群では、明らかな影響は確認できなかった。FABP2のIHC染色では、CMR投与群、MCT2w投与群、EC投与群において強い染色性が確認された。

遺伝子発現解析では、TNF- α は、APAP低用量中用量投与群、CMR4週投与群、MCT 2週、4週 i.p. 投与群、EC投与群において増加傾向にあった。FABP1は、対照群と比較して、有意な変化はなかったが、APAP低用量と中用

量、CMR2500 ppm13週投与群、ECにおいて増加傾向が確認された。

2) *in vitro*評価

病理組織学的に、PB投与群ならびにCMR投与群では肝細胞肥大、MCT投与群では核数の多い細胞の増加、EC投与群では配列の乱れや核の濃染が確認された。

CaspaseのIHCでは、PB投与群、MCT投与群で染色性を確認された。FABP2のIHC染色では、EC投与群では強い染色性を示し、CMR投与群ならびにMCT投与群に

おいて部位差はあるものの染色性が確認された。

遺伝子発現解析では、TNF- α は、APAP高用量、MCT低用量において増加傾向にあった。FABP1は、PBのみで増加傾向にあった。

小核試験では、EC投与群、MCT投与群、CMR投与群において、小核数の増加ないし増加傾向が確認された。

D. 考察

本研究では、複数の肝毒性物質を用いて *in vivo* および *in vitro* における毒性変化を比較検討した。解剖時体重は全肝毒性物質投与群において減少傾向を示し、全身性の負荷が生じていた可能性が示唆された。一方で、PB投与群およびCMR投与群では臓器重量の有意な増加が認められ、病理組織学的にも肝細胞肥大が確認されたことから、これらの肝重量増加は酵素誘導や代謝適応に伴う肥大性変化に起因すると考えられた。

血液生化学検査では、APAP、CMR、MCT、EC投与群でALTの増加傾向が認められ、肝細胞障害の発現が示唆された。特にAPAPは小葉中心性壊死を呈しており、既知の肝毒性機序と一致する結果であった。

トリパンブルー染色による細胞毒性評価では、全物質で濃度依存的な細胞死の増加が認められ、*in vitro* 系においても肝毒性を捉えられることが示唆された。

病理組織学的解析では、*in vivo* においてAPAPで小葉中心性壊死、PBおよびCMRで肝細胞肥大、MCTで2核細胞の増加が確認された。*in vitro* においてもPBおよびCMRで肥大、MCTで核数の多い細胞の増加が認められ、形態学的変化の再現性が示唆された。一方、EC投与群では *in vivo* で明らかな形態変化は認められなかったが、*in vitro* では配列の乱れや核濃染が観察されており、培養系特有の感受性や評価指標の差が影響した可能性が考えられた。

免疫組織学的解析では、EC投与群においてF4/80陽性マクロファージの増加が確認され、炎症反応の関与が示唆された。TNF- α 遺伝子発現も複数群で増加傾向を示しており、肝障害に伴う炎症応答の誘導が示された。Caspase染色では一部群で弱い陽性が認められたものの顕著ではなく、壊死主体の毒性機序が関与している可能性が考えられる。また、FABP2およびFABP1の発現変動から、CMR、MCT、ECにおいて脂質代謝異常の関与が示唆され、*in vitro* においても類似した染色性が確認されたことから、脂質関連毒性の再現性が示された。

染色体異常の検出を目的とした小核試験では、EC、MCT、CMR投与群で増加ないし増加傾向が認められ、これら物質が染色体異常を有することによる遺伝毒性リスクが示唆された。

全体を通し、本分担研究で用いた *in vitro* 系は、肝

細胞肥大や多核化などの構造的変化および一部の分子応答を *in vivo* と同様の傾向で再現し得ることが示された。一方で、全身性要因に依存する反応は完全には再現されず、本評価系の限界も明らかとなった。

以上の検討より、肝臓オルガノイドを用いた *in vitro* 毒性試験法が既存の *in vivo* 肝毒性試験を一定程度は補完し得る評価手法であることが示された。動物実験代替法として発展させるため、さらなる検証が重要と考えられた。

E. 結論

本研究では、*in vivo* 試験および *in vitro* 試験により、肝毒性陽性対照物質を用いて肝臓に対する毒性学的影響を評価した。その結果、肝臓における応答は毒性物質の作用機序により異なることが明らかとなった。

in vivo 試験では、各毒性物質に応じて肝組織の形態学的変化や炎症応答を評価することが可能であり、生体内での代謝や免疫応答を含めた多様な影響を反映した結果が得られた。一方で、*in vitro* 試験では肝細胞に対する直接的な影響により、各毒性物質において特性が明確に示された。

両試験系の比較から、同一毒性物質において *in vivo* および *in vitro* 評価系に共通すると考えられる毒性学的影響も観察された。*in vitro* 試験では、オルガノイド構成肝細胞に対する直接的な影響が検出され、新たな肝毒性評価系としての有用性を示す検証結果が得られているものと考えた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 宮崎 飛翔, 石ケ守 里加子, 長谷川 晋也, 藤岡正喜, 加藤 孝一, 美谷島 克宏, 戸塚 ゆ加里, マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 毒性試験法の開発、第 38 回発癌病理研究会 (2025 年 8 月、九十九里、千葉)
2. 宮崎 飛翔, 石ケ守 里加子, 長谷川 晋也, 藤岡正喜, 加藤 孝一, 美谷島 克宏, 戸塚 ゆ加里, マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性試験法の開発、第 54 回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025 年 11 月、静岡)
3. 大橋 清佳, 天田 佳秀, 煙山 紀子, 前川 竜也, 戸塚 ゆ加里, 美谷島 克宏, 肝毒性物質の投与によるマウス肝臓における FABP 発現の変動に関する解析、第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、ウイंकあいち (愛知県産業労働センター) 2026 年 1 月 23 日
4. 宮崎 飛翔, 石ケ守 里加子, 長谷川 晋也, 藤岡正喜, 吉田 健一, 大野 麻理奈, 小川 誠司, 垣内 伸之, 川口 駿, 渡部 光一, 中馬 新一郎, 加藤 孝一, 美谷島 克宏, 樋口 裕一郎, 上原 正太郎, 戸塚 ゆ加里, マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 遺伝毒性試験法の開発、日本薬学会第 146 年会 (2026 年 3 月、大阪)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

3次元培養系と次世代シーケンサーによる変異解析手法（ec-NGS）を組み合わせた
化学物質の遺伝毒性評価法の開発
ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発
に関する研究

研究代表者 戸塚 ゆかり 星薬科大学 教授

研究要旨

今年度は、実験動物を用いた安全性評価の 3Rs 推進とヒト外挿性の向上を目指し、マウス肝細胞由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性評価系の構築、およびヒト型代謝活性化系の導入に向けた検討を行った。初期 DNA 損傷の指標として γ -H2AX の発現を評価した結果、非遺伝毒性物質（PB）で陰性、遺伝毒性物質（EC、MCT、CMR）で陽性細胞率の増加が認められた。この結果は、同一条件で実施した小核試験の結果と整合性を示し、本評価系が化学物質の DNA 損傷評価において優れた予測能を有することが実証された。次いで、ヒト由来の代謝系を組み込んだ共培養系の構築に向け、マウス肝細胞由来オルガノイドとヒト肝キメラマウス由来の HepaSH 細胞の共培養に向けた培地条件の最適化を試みた。HepaSH においては、推奨培地である Cellatis を含む混合培地（OGM:Cellatis, 2:1 および 1:1）の使用により、主要な薬物代謝酵素（CYP1A2、2E1、3A4）の発現を 14 日間維持することが可能であった。一方、オルガノイドにおいては、Cellatis との混合培地で Hnf4a、CYP3A11、Alb といった肝成熟化マーカーの発現を増強させ、未分化な状態から成熟相への移行が促進されることが示唆されたが、OGM:Cellatis, 2:1 混合培地であれば、ある程度組織学的恒常性が維持可能であると判断した。現在、この条件下で MCT を含む被験物質の DNA 損傷性および遺伝毒性について検討を進めている。

A. 研究目的

化学物質の開発には安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。ヒトへの外挿性が高い試験として、トランスジェニック（TG）動物を用いた変異原性評価が注目されているものの、現状ではヒト代謝を十分に加味した試験系とはなっていない。また、化審法などの対象となるすべての化学物質に対して、ヒトの発がん性リスクを動物実験で評価することは、昨今の動物愛護 3Rs（Replacement・Reduction・Refinement）の観点からも現実的でなく、新規の動物実験代替法の開発・導入が求められている。一方、汎用されている *in vitro* 遺伝毒性試験はいずれも均質な細胞を用いての評価系であり、生体への外挿の点で限界がある。これに加え、従来の *in vitro* 遺伝毒性試験はいずれも化学物質の代謝活性化に齧歯類の代謝系（S9）を用いており、これを単純にヒト由来の S9 に変更するという手法だけでは十分にヒトの代謝を反映した結果を得ることが出来ないことに加え、ヒト由来の代謝系材料の調達にも課題がある。

このような背景から、本研究では化学物質の発がん性予測のための新規遺伝毒性評価手法として、3D 培養により作成したオルガノイドを用い、ヒトへの外挿性が高くかつ迅速で簡便な *in vitro* 遺伝毒性試験の開発を試みる。多くの化学物質が肝臓に対して毒性を示すことから、本研究では肝臓を対象とした評価系の構築を検討する。

今年度は、遺伝毒性の指標として DNA 二本鎖切断の指標である γ -H2AX を用いた評価法を検討した。また、これまで、代謝活性化系にラット S9 を使用してきた。しかし、化学物質によってはげっ歯類とヒトで代謝様式が異なるものがあり、ヒトへの外挿性の点で課題が残る。そこで、ヒト肝キメラマウス由来の HepaSH 細胞を用い

ることでヒト型代謝活性化系の導入を検討した。

B. 研究方法

① γ -H2AX を指標とした DNA 損傷性評価の検討

オルガノイドを播種し 3 日間培養後、陽性対照としてエチルメタンスルフォネート（EMS, 250 μ g/mL）を、被験物質としてフェノバルビタール（PB, 1000 μ M）、カルバミン酸エチル（EC, 100 mM）、モノクロタリン（MCT, 500 μ M）およびクマリン（CMR, 200 μ M）を代謝活性化系であるラット S9 mix 存在下にて 24 時間曝露し、シングルセルにして細胞を回収した。4%パラホルムアルデヒドで固定後、グリシン含有 PBS および PBS で洗浄を行った。細胞を PBS で再懸濁させ、スライドガラスに滴下し風乾させた。次いで、0.1% TritonX-100 を用いて透過処理を行い、一次抗体（Anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139) Rabbit mAb）で反応後洗浄した。次いで、二次抗体（Donkey anti rabbit IgG alexa fluor 647）で染色し再度洗浄を行った。最後に DAPI で核を染色し封入後、蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡を用いて γ -H2AX foci の形成を観察した。

② マウス肝オルガノイドと HepaSH 共培養条件の検討

HepaSH 推奨培地：Cellatis Power Primary HEP Medium (Cellatis)

オルガノイド培地：HepatiCult Organoid Growth Medium (OGM)

1. HepaSH での培地の検討

HepaSH を播種後、培地を 1:0, 2:1, 1:1, 0:1 (OGM:Cellatis) で混合し 1 日おきに培地を交換した。培地を任意の培地に変更後 1, 7, 14 日目に細胞を回収した。RNA を抽出し RT-qPCR にて薬物代謝酵素である CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 の発現を指標に評価した。また、培地交

換の際に顕微鏡下で形態変化の観察を行った。

2. オルガノイドでの検討

オルガノイドを播種後3日間OGMで培養した。その後、培地を1:0, 2:1, 1:1 (OGM:Cellatis)の割合で混合した培地に交換し、1, 7, 14日目に細胞を回収した。なお、培地交換はHepaSH細胞と同様に1日おきに行った。回収した細胞からRNAを抽出し、RT-qPCR法を用いて各標的遺伝子の発現評価を行った。対象遺伝子にはHnf4a, Ttr (肝細胞マーカー)、Sox9 (肝前駆細胞マーカー)、Krt19 (胆管マーカー)、Alb, CYP3A11 (成熟肝細胞マーカー) およびKi67 (細胞増殖マーカー) を用いた。加えて、培地交換の際に顕微鏡下での形態観察を行い、培養環境の相違による細胞の経時的な変化を記録した。

(倫理面の配慮)

該当なし。

C. 研究結果

① γ -H2AXを指標としたDNA損傷性評価の検討

オルガノイドにポジティブコントロールとしてEMSを曝露し γ -H2AXを蛍光免疫染色した結果、 γ -H2AXの発現を観察することができた (図1)。

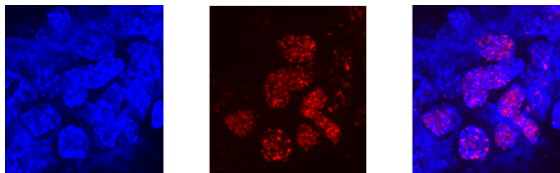


図1. EMS曝露後の γ -H2AX発現解析
(左:DAPI, 中央: γ -H2AX, 右:merge)

オルガノイドに被験物質を曝露し、蛍光免疫染色した結果を図2に示す。Control群およびPB曝露群では、DAPIによって核が明瞭に染色されている一方で、 γ -H2AXのシグナルはほとんど観察されず、DNA損傷が軽微であることが確認された。一方、EC、MCTおよびCMR曝露群では核内に γ -H2AXの発現が認められ、DNAへの影響が示唆された。特にMCT曝露群では、 γ -H2AXの強いシグナルが観察された。

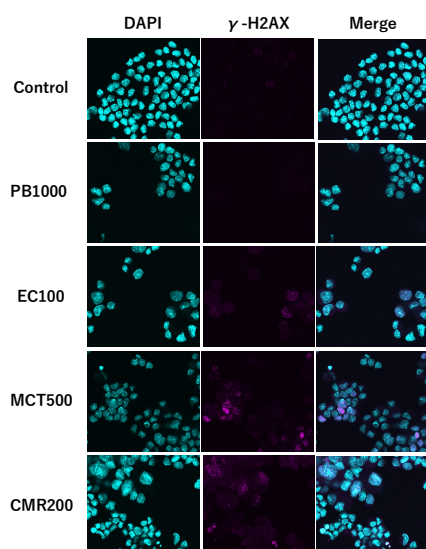


図2. 被験物質曝露後の γ -H2AX発現解析

γ -H2AX陽性細胞率の測定結果を図3に示す。非遺伝毒

性発がん物質であるPBを曝露した群では、陽性細胞数の割合はコントロールと比較して顕著な変化は認められなかった。一方で、遺伝毒性発がん物質であるEC、MCTおよびCMRを曝露した群では、いずれもコントロールよりも陽性細胞の割合が増加する傾向が確認された。特にMCT曝露群では、他の被験物質と比較して陽性細胞率が高く、顕著なDNA損傷の誘発が示唆された。また、これらの結果は、観察画像の所見とも一致していた。

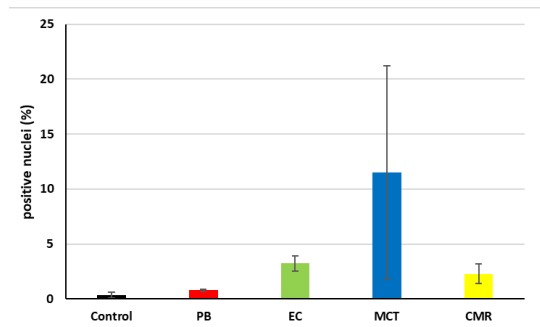


図3. 各種化学物質曝露によるオルガノイドの γ -H2AX陽性細胞率

② マウス肝オルガノイドとHepaSH共培養条件の検討

1. HepaSHでの培地の検討

遺伝子発現解析の結果、OGM単独では7日目にはCYP3A4やCYP1A2などが低下、消失していた。Cellatisを含む培地群では14日目までCYP1A2, CYP2E1, CYP3A4すべての発現を維持することができた (図4)。形態的变化は確認されなかった (図5)。

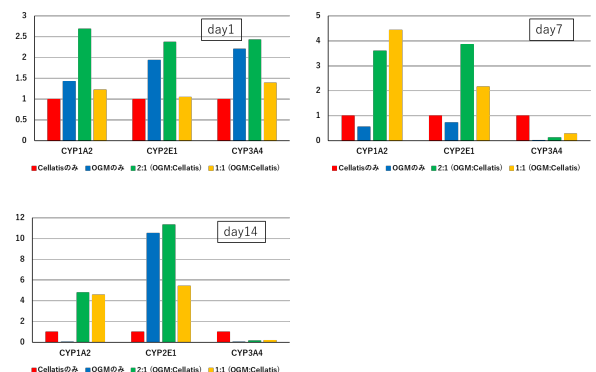


図4. HepaSH遺伝子発現解析

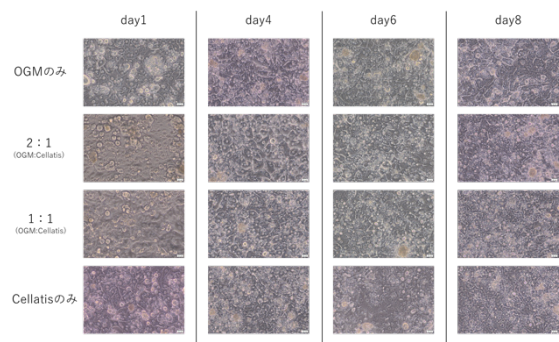


図5. HepaSH形態観察

2. オルガノイドでの検討

各種培地条件（OGMのみ、2:1混合、1:1混合）で培養したオルガノイドにおける、遺伝子発現変化を解析した結果を図6に示した。なお、day14の解析結果は、発現量が極めて高いHnf4aと、その他の指標を同一のスケールで比較することが困難であり、y軸スケールを変えた2つのグラフに分けて示した。肝細胞マーカーおよび成熟化指標の発現は、Hnf4aが培養日数の経過とともに混合培地群（2:1および1:1）で著しく上昇し、特にday14の2:1混合群は、OGMのみの群と比較して極めて高い発現が認められた。一方、Ttrはday1では培地の違いによる発現の差はみられなかったが、day7以降はOGMのみの群と比較してやや低下する傾向が確認された。成熟肝細胞マーカーであるCYP3A11およびAlbについては、day1で混合培地群において発現上昇が認められ、day14においてもこれらの遺伝子はOGMのみの群と比較して約1.5倍から2倍程度発現していた。分化および胆管マーカーの発現に関しては、肝前駆細胞マーカーであるSOX9の発現がいずれの混合培地群においてもday7以降に減少を示し、未分化性の低下が確認された。一方で、胆管マーカーであるKrt19の発現は、混合培地群においてOGMのみの群を上回る傾向がみられた。細胞増殖能の指標となるKi67の発現はOGM群と比較したところ、day1では混合培地群においてわずかに高い値を示したものの、day7以降は減少し、OGM群より低い値を示した。各種培地条件におけるマウス肝臓オルガノイドの形態変化を顕微鏡下で観察した結果を図7に示す。播種直後（day0）では、いずれの条件においても細胞が分散した状態であった。培養7日目（day7）では、すべての群でオルガノイドの形成が進み、サイズの増大が確認された。培養14日目（day14）においては、1:1混合培地群において、一部のオルガノイドで形態が崩れ始める細胞像が確認された。

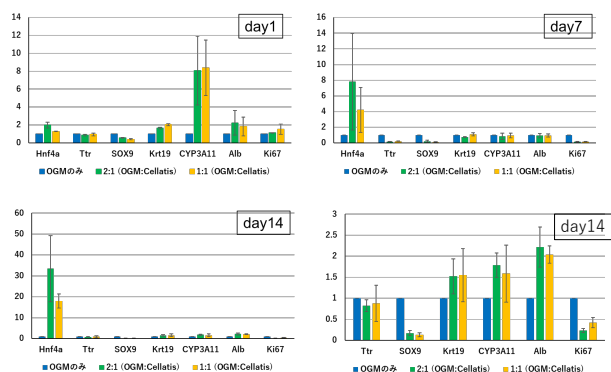


図6. オルガノイド遺伝子発現解析

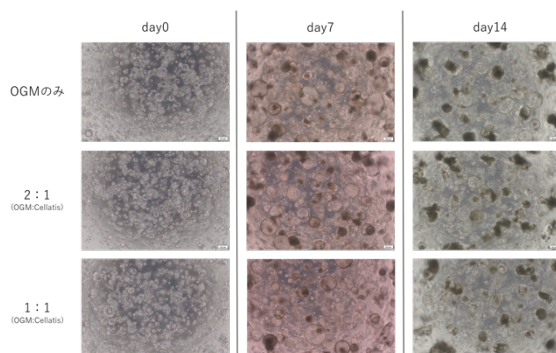


図7. オルガノイドの形態観察

D. 考察

DNA二本鎖切断の指標である γ -H2AXの発現を評価した結果、EMSの曝露により明確な γ -H2AXfociが確認され、マウス肝臓由来オルガノイドを用いて γ -H2AX発現解析が可能であることが示唆された。非遺伝毒性発がん物質であるPB曝露群においては陽性細胞率の上昇が認められなかったが、遺伝毒性発がん物質であるEC、MCTおよびCMR曝露群では、いずれも陽性細胞率が増加傾向を示した。この結果は、以前我々が同一のオルガノイドおよび曝露条件（化学物質・濃度）を用いて実施した小核試験の結果と同様の傾向であり、先行データとの整合性が確認された。このことから、本評価系が化学物質による初期DNA損傷を正確に捉えているだけでなく、その損傷がその後の染色体異常（小核形成）へと繋がることも考えられた。さらに、従来の遺伝毒性試験を補完できるだけでなく、迅速なスクリーニング指標となり得ることも示唆された。

マウス肝臓オルガノイドとHepaSH共培養条件の検討結果より、HepaSH細胞はOGM単独では7日目にはCYP3A4やCYP1A2などが消失、低下していた。Cellatisを含む培地群では14日目までCYP1A2、CYP2E1、CYP3A4すべての発現を維持することができた。そのため、HepaSHの薬物代謝酵素を長期的に維持するには2:1(OGM:Cellatis)あるいは1:1(OGM:Cellatis)の培地で培養することが妥当であると判断した。オルガノイドでは、混合培地群（2:1および1:1）で肝細胞マーカーであるHnf4aならびに成熟肝細胞マーカーであるCYP3A11やAlbの発現が増強されたことは、Cellatis培地の添加がオルガノイドの成熟化を促進したことが示唆された。これに並行して、肝前駆細胞マーカーであるSOX9の減少と増殖指標であるKi67の低下が認められた。これらのことから、成熟化の進行に伴い細胞増殖が抑制されたと考えられる。一方、形態観察の結果、1:1混合培地群ではday14において一部のオルガノイドで形態の崩壊が認められた。この現象は、Cellatis成分の濃度が過剰となり、オルガノイドの恒常性維持に負荷が生じた結果であると推察される。以上の結果から、共培養条件には2:1(OGM:Cellatis)の混合比率が妥当であると考えられる。

E. 結論

本研究では、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた γ -H2AX発現解析の検討、およびヒト肝細胞株HepaSHとの共培養に向けた至適培地条件の検討を行った。 γ -H2AX発現解析では、EMSによるDNA損傷を感度良く検出できることを確認した。被験物質を用いた検討では、非遺伝毒性物質(PB)が陰性で、遺伝毒性物質(EC、MCTおよびCMR)では陽性細胞率の増加傾向が認められ、先行する小核試験データとも整合性を示した。これにより、本評価系が従来の遺伝毒性試験の補完だけでなく、迅速なスクリーニング指標となり得ることが示唆された。共培養に向けた培地検討では、Cellatisを含む混合培

地の使用により、HepaSHにおける薬物代謝酵素(CYP1A2, 2E1, 3A4)の発現維持、およびオルガノイドにおける肝成熟化マーカー(Hnf4a, Alb, CYP3A11)の増強が確認された。形態保持能の観点から、オルガノイド長期培養時に構造崩壊が認められた1:1混合条件に対し、組織学的恒常性を維持可能な2:1(OGM:Cellatis)混合培地を至適条件と判断した。現在、この条件下でMCTを含む被験物質遺伝毒性試験のDNA損傷性および遺伝毒性について検討を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishigamori R., Ohno A., Fukuhara K., Hasegawa S., Totsuka Y. Genotoxicity assessment of mesoporous silica and graphene oxide in GDL1 cells. *Genes Environ.* 2025 48 (1): 2.
2. Betsuyaku Y., Motohashi M., Sassa A., Takamura-Enya T., Totsuka Y. Analysis of Novel DNA Adducts Derived from Acetaldehyde. *Biomolecules.* 2025 15 (6): 878.

2. 学会発表

1. 戸塚 ゆ加里 正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発、第52回日本毒性学会(2025年7月、那覇、沖縄)
2. 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚 ゆ加里、末水洋志、*in vitro*薬剤誘発性リン脂質症評価におけるHepaSH細胞の有用性、第52回日本毒性学会(2025年7月、那覇、沖縄)
3. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、加藤 孝一、美谷島 克宏、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規*in vitro*毒性試験法の開発、第38回発癌病理研究会(2025年8月、九十九里、千葉)
4. Yukari Totsuka¹, Momoko Nagai², Asmaa Elzawahari², Rikako Ishigamori¹, Shinya Hasegawa¹, Mamoru Kato, Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, EMGS2025 (2025年9月、ニューヨーク、米国)
5. 戸塚 ゆ加里 環境発がん因子の解明に向けた変異シグネチャーとDNA付加体の解析、第32回がん予防大会(2025年9月、名古屋、愛知)
6. 小池遥己、小高和大、渋谷優空、関根 航、茅野朋子、松本真理子、藤岡正喜、鈴木周五、魏民、戸塚 ゆ加里、有機フッ素化合物(PFAS)の遺伝毒性評価第32回がん予防大会(2025年9月、名古屋、愛知)
7. Yukari Totsuka, Comprehensive Insights into Environmental Carcinogenesis via DNA Adducts and Genome-wide Mutation Profiling, 第84回日本癌学会学術総会(2025年9月、金沢)
8. 石ケ守 里加子、大野 彰子、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いたアドバンストマテリアルの遺伝毒性評価、第84回日本癌学会学術総会(2025年9月、金沢)
9. 長谷川晋也、渡部光一、川口駿、垣内伸之、小川誠司、吉田健一、戸塚 ゆ加里、加熱タバコ製品の吸入曝露による遺伝毒性と変異スペクトラム、第84回日本癌学会学術総会(2025年9月、金沢)
10. Yukari Totsuka, Decoding Environmental Carcinogenesis for Cancer Prevention: Insights from

DNA Adduct and Mutation Profiling, 2025 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (2025年10月、ソウル、韓国)

11. 戸塚 ゆ加里、環境要因によるDNA付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索とメカニズムの解明、第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会(2025年10月、大阪)
12. 戸塚 ゆ加里、次世代シーケンサー(NGS)とアダクトーム解析を用いた遺伝毒性物質の探索と発がんメカニズムに関する研究、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 学会賞受賞講演(2025年11月、静岡)
13. 石ケ守 里加子、大野 彰子、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンストマテリアルの包括的毒性評価、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会(2025年11月、静岡)
14. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、加藤 孝一、美谷島 克宏、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性試験法の開発、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会(2025年11月、静岡)
15. 長谷川 晋也、石ケ守 里加子、大野 麻理奈、吉田健一、垣内 伸之、渡部 光一、川口 駿、小川 誠司、戸塚 ゆ加里、ヒト胎児腎臓細胞株である293FT細胞を用いたError-corrected NGSによる化学物質の変異シグネチャー解析、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会(2025年11月、静岡)
16. 戸塚 ゆ加里、オルガノイド技術を用いた環境化学物質影響評価、日本学術会議主催学術フォーラム(2025年12月、六本木、東京)
17. 戸塚 ゆ加里、ヒトへの外挿性を考慮した新規*in vivo*代替型遺伝毒性評価法の開発、日本薬学会第146年会(2026年3月、大阪)
18. 小畑 悠樹、上原 正太郎、樋口 裕一郎、戸塚 ゆ加里、末水 洋志、ヒト肝キメラマウスにおけるメトトレキサートの代謝および腎毒性、日本薬学会第146年会(2026年3月、大阪)
19. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡 正喜、吉田 健一、大野 麻理奈、小川 誠司、垣内 伸之、川口 駿、渡部 光一、中馬 新一郎、加藤 孝一、美谷島 克宏、樋口 裕一郎、上原 正太郎、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規*in vitro*遺伝毒性試験法の開発、日本薬学会第146年会(2026年3月、大阪)
20. 長谷川 晋也、石ケ守 里加子、高橋 賢吾、遠藤 瑞葵、戸塚 ゆ加里、ヒト胎児腎臓細胞株を用いたDNA損傷を指標とした化学物質の変異原性の評価、日本薬学会第146年会(2026年3月、大阪)
21. 今井 正彦、小川 心音、川西 なつき、中山 瑞穂、大島 正伸、戸塚 ゆ加里、大腸がんモデルオルガノイドを用いた化学物質のプロモーション活性評価法の構築、日本薬学会第146年会(2026年3月、大阪)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

3次元培養系と次世代シーケンサーによる
変異解析手法（ec-NGS）を組み合わせた化学物質の遺伝毒性評価法の開発
分担研究項目：ヒト肝キメラマウスを用いた *in vivo* 毒性評価、HepaSH 細胞の提供

研究分担者 樋口 裕一郎 ……公益社団法人実中研・室長

研究要旨

ヒト肝キメラマウスへのモノクロタリン投与試験を遂行し、遺伝毒性試験における同モデルの有効性について検証を行った。また *in vitro* 共培養系の構築に使用するヒト肝キメラマウス由来ヒト肝細胞、HepaSH 細胞の生産-提供を実施した。

A. 研究目的

化学物質の開発には安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。ヒトへの外挿性が高い試験として、トランスジェニック (TG) 動物を用いた変異原性評価が注目されているものの、現状ではヒト代謝を十分に加味した試験系とはなっていない。また、化審法などの対象となるすべての化学物質に対して、ヒトの発がん性リスクを動物実験で評価することは、昨今の動物愛護3Rs (Replacement・Reduction・Refinement) の観点からも現実的でなく、新規の動物実験代替法の開発・導入が求められている。一方、汎用されている *in vitro* 遺伝毒性試験はいずれも均質な細胞を用いた評価系であり、生体への外挿の点で限界がある。これに加え、従来の *in vitro* 遺伝毒性試験はいずれも化学物質の代謝活性化に齧歯類の代謝系 (S9) を用いており、これを単純にヒト由来のS9に変更するという手法だけでは十分にヒトの代謝を反映した結果を得ることが出来ないことに加え、ヒト由来の代謝系材料の調達にも課題がある。

このような背景から、本研究では化学物質の発がん性予測のための新規遺伝毒性評価手法として、3D培養により作成したオルガノイドを用い、ヒトへの外挿性が高くかつ迅速で簡便な *in vitro* 遺伝毒性試験の開発を試みる。多くの化学物質が肝臓に対して毒性を示すことから、本研究では肝臓を対象とした評価系の構築を検討する。

B. 研究方法

オルガノイドで評価した化学物質をヒト肝キメラマウスに曝露し、得られた結果について比較することで、開発したオルガノイドを用いた遺伝毒性試験法の動物実験代替法としての妥当性・有用性について検証する。またヒトへの外挿性を高めるため、ヒト肝キメラマウス肝臓から単離したヒト肝細胞、HepaSH細胞とオルガノイドとの共培養系の開発についても併せて検討する。

（倫理面への配慮）

本研究は動物実験等の実施に関する基本指針に従い、公益財団法人実中研・動物実験委員会により審査・承認されている。（許可番号：AIA230058, AIA240058）

C. 研究結果

ヒト肝キメラマウスへのモノクロタリン投与試験を遂行し、遺伝毒性試験における同モデルの有効性について検証を行った。このうち腹腔内投与群では時間経過とともに血中肝傷害指標の上昇と、体重の

減少を観察することが出来た。また星薬科大学へ HepaSH 細胞を計 4 回-25 単位 (55 million cells 相当) 頒布し、*in vitro* 共培養系の構築に貢献した。

D. 考察

モノクロタリンを投与したヒト肝キメラマウスにおいて、肝傷害の誘導を期待できる兆候が得られている。今後は投与個体より採取したキメラ肝臓の病理解析、並びに ec-NGS 解析を進め、評価系としての同モデルの妥当性を検証する必要がある。

E. 結論

ヒト肝キメラマウスを用いた遺伝毒性試験について解析を進め、次年度以降の試験について候補薬物の選定、並びに評価方法の見直しを進めていく。また HepaSH 細胞の提供についても必要に応じて柔軟に対応できるよう、準備を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚ゆ加里、末水洋志、*in vitro* 薬剤誘発性リン脂質症評価における HepaSH 細胞の有用性、第52回日本毒性学会（2025年7月、那覇、沖縄）
- 小畑 悠樹、上原 正太郎、樋口 裕一郎、戸塚 ゆ加里、末水 洋志、ヒト肝キメラマウスにおけるメトトレキサートの代謝および腎毒性、日本薬学会第146年会（2026年3月、大阪）
- 宮崎 飛翔、石ヶ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡 正喜、吉田 健一、大野 麻理奈、小川 誠司、垣内 伸之、川口 駿、渡部 光一、中馬 新一郎、加藤 孝一、美谷島 克宏、樋口 裕一郎、上原 正太郎、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 遺伝毒性試験法の開発、日本薬学会第146年会（2026年3月、大阪）

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

3次元培養系と次世代シーケンサーによる
変異解析手法（ec-NGS）を組み合わせた化学物質の遺伝毒性評価法の開発
分担研究項目：ゲノム変異解析

研究分担者 長谷川 晋也 ……………星薬科大学・講師

研究要旨

本研究では、化学物質の発がん性予測に資する新規 *in vitro* 遺伝毒性評価法の開発を目的として、マウス由来肝前駆細胞オルガノイドおよびマウス個体肝臓を用い、Error-Corrected NGS (NanoSeq) によるゲノム変異解析を実施した。Monocrotaline (MCT) 曝露では、オルガノイドおよびマウス肝臓のいずれにおいても変異頻度の上昇が認められ、特に C>A 変異の顕著な増加が観察された。さらに、変異シグネチャー解析により、MCT 処理に伴って濃度依存的に増加する SBS 成分が検出され、C>A 変異には strand bias も認められたことから、MCT による DNA 損傷形成および修復過程が変異導入に関与している可能性が示唆された。

一方、Ethyl carbamate (EC) については、マウス肝臓において T>A を中心とした変異パターンの変化および変異頻度の上昇が認められ、*in vivo* 条件下で明確な変異誘導が確認された。しかし、同条件で処理したオルガノイドでは変異頻度および変異スペクトラムに明確な変化は認められず、*in vitro* と *in vivo* の結果に差異がみられた。また、Coumarin では、オルガノイドおよびマウス肝臓のいずれにおいても顕著な変異頻度の増加は観察されなかった。これらの結果から、オルガノイドを用いた遺伝毒性評価系は、MCT のような化学物質に対しては *in vivo* と対応する変異シグネチャーを検出できる一方、化学物質によっては曝露条件の最適化が必要であると考えられた。今後は、曝露時間の延長、反復曝露回数の検討、低濃度長期曝露条件の導入などにより、変異蓄積をより適切に評価できる実験系を構築し、次世代遺伝毒性評価法としての有用性を高めることが重要である。

A. 研究目的

化学物質の開発には安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。ヒトへの外挿性が高い試験として、トランスジェニック (TG) 動物を用いた変異原性評価が注目されているものの、現状ではヒト代謝を十分に加味した試験系とはなっていない。また、化審法などの対象となるすべての化学物質に対して、ヒトの発がん性リスクを動物実験で評価することは、昨今の動物愛護3Rs (Replacement・Reduction・Refinement) の観点からも現実的でなく、新規の動物実験代替法の開発・導入が求められている。一方、汎用されている *in vitro* 遺伝毒性試験はいずれも均質な細胞を用いての評価系であり、生体への外挿の点で限界がある。これに加え、従来の *in vitro* 遺伝毒性試験はいずれも化学物質の代謝活性化に齧歯類の代謝系 (S9) を用いており、これを単純にヒト由来のS9に変更するという手法だけでは十分にヒトの代謝を反映した結果を得ることが出来ないことに加え、ヒト由来の代謝系材料の調達にも課題がある。

このような背景から、本研究では化学物質の発がん性予測のための新規遺伝毒性評価手法として、3D培養により作成したオルガノイドを用い、ヒトへの外挿性が高くかつ迅速で簡便な *in vitro* 遺伝毒性試験の開発を試みる。多くの化学物質が肝臓に対して毒性を示すことから、本研究では肝臓を対象とした評価系の構築を検討する。

B. 研究方法

Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析

マウス由来肝前駆細胞オルガノイド (STEMCELL Technologies) を用い、*in vitro* において化学物質の曝露試験を実施した。オルガノイドは一定期間培養後、ラット由来 S9 mix を用いた代謝活性化条件下で MCT を処理した。

マウス肝臓オルガノイドにS9mix存在下で、MCTの3回曝露実験を行った。播種後3日間培養したオルガノイドへ1回目の曝露(24時間)を行い、洗浄した後に新しい培地を添加した。3日間培養した後、オルガノイドを回収し再播種を行った。3日後、2回目の曝露(24時間)を行い、洗浄後に新しい培地を添加した。6日間培養後、3回目の曝露(24時間)を行い洗浄した後、TrypLEを用いてオルガノイドを回収した。なお、MCT の培地中最終濃度は 125、500 μ M、Ethyl carbamate (EC) の最終濃度は 25、100 mM、Coumarin (CMR) の最終濃度は 50 μ M、200 μ M とした。回収したオルガノイドよりAllPrep DNA/RNA Kit (QIAGEN) を用いてゲノムDNAを抽出し、ec-NGS (Nano-Seq) 解析を行った。

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

(倫理面の配慮)
該当なし

C. 研究結果

① マウス由来肝前駆細胞オルガノイドにおける Mono crostaline (MCT) の変異シグネチャー

マウス由来肝前駆細胞オルガノイドに対し、Monocro taline (MCT) を 125 μ M または 500 μ M の条件で処理し、ラット S9 mix による代謝活性化条件を組み合わせた *in vitro* 曝露系を構築した。曝露後に DNA を抽出し、error-corrected NGS (NanoSeq) による変異解析を実施し、Mutational burden、および Trinucleo tides mutation pattern を解析した。NanoSeq 解析の結果、MCT 処理により Mutational burden の増加が認められた。また、高濃度の MCT 処理群では C>A 変異の増加が観察された。

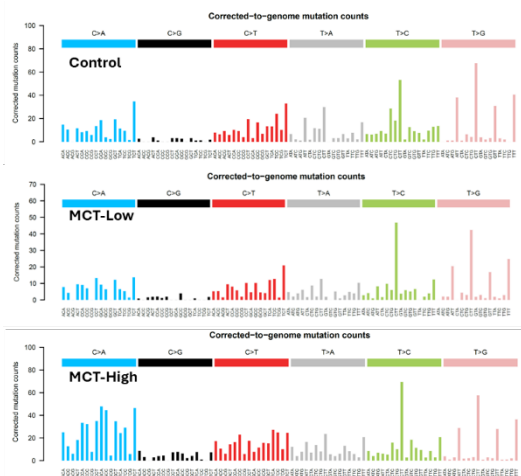


図1. オルガノイドにおける MCT の変異シグネチャー

② マウス肝臓における MCTの変異シグネチャー

MCT を 20 mg/kg または 200 mg/kg 投与したマウス個体の肝臓を用いて NanoSeq 解析を行った。その結果、*in vitro* オルガノイド系と同様に、MCT 投与群において C>A 変異の増加が認められた (図2)。この増加は投与量依存的であり、高用量群 (200 mg/kg) でより顕著であった。

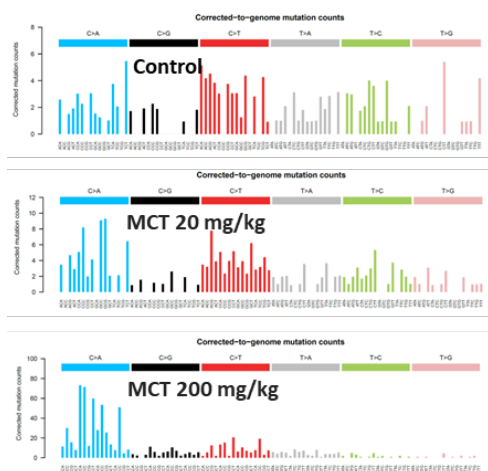


図2. マウス肝臓における MCT の変異シグネチャー

③MCT の変異シグネチャー解析

変異シグネチャーの抽出を行った結果、MCT 処理条件下で増加する SBS96B と、対照群にも認められる SBS 96A が同定された。SBS96B は MCT 濃度依存的に増加しており、MCT 処理により誘導される変異成分である可能性が高い。一方、SBS96A は培養条件等に由来する背景シグネチャーであると考えられた (図3、上)。さらに、SBS288 系列の解析では、MCT 処理により SBS288B が増加し、このシグネチャーにおいて C>A 変異が転写鎖側に偏って増加する strand bias が認められた (図3、下)。この結果は、MCT による DNA 損傷形成および修復過程が転写活性と関連している可能性を示唆するものである。

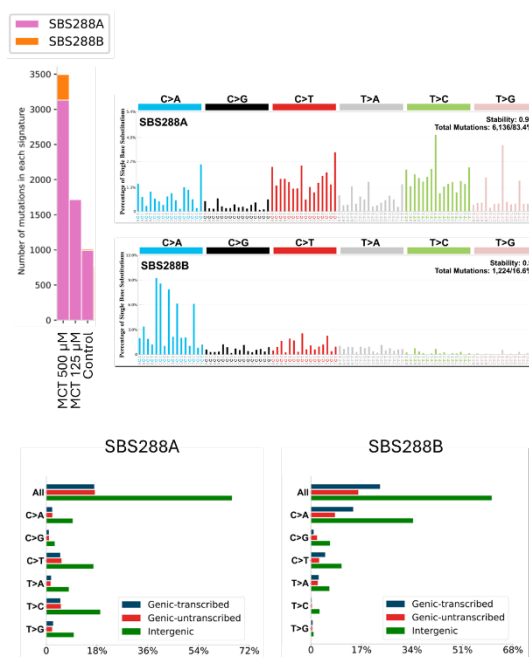


図3. MCT の変異シグネチャー解析

④マウス由来肝前駆細胞オルガノイドにおける Ethyl carbamate (EC) の変異シグネチャー

EC について、マウス由来肝前駆細胞オルガノイドを用いて低用量および高用量条件で処理し、同様に Nano Seq 解析を実施した。その結果、EC 処理オルガノイドでは、変異頻度は対照群と同程度であり、明確な増加は認められなかった。

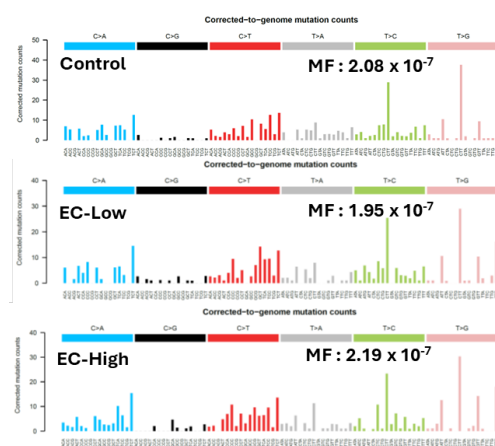


図4. オルガノイドにおける EC の変異シグネチャー

⑤ マウス肝臓における EC の変異シグネチャー

一方、EC を投与したマウス個体の肝臓では、対照群と比較して変異頻度の顕著な増加が認められた。Trinucleotides mutation pattern では、T>A を中心とした塩基置換の増加が観察された。抽出された変異シグネチャーは MCT 由来の SBS 構成とは異なり、EC 特有の変異導入機構を反映している可能性が示唆された。さらに、ストランドバイアス解析の結果、EC 投与マウス肝臓においては、T>A や T>C の塩基置換において 転写鎖と非転写鎖の間で非対称な分布が認められた。この結果は、EC が *in vivo* 条件下で DNA 付加体形成により変異導入が生じている可能性を示唆するものである。



図5. マウス肝臓における EC の変異シグネチャー

⑥オルガノイドにおける Coumarin の変異シグネチャー

マウス由来肝前駆細胞オルガノイドに低用量および高用量条件で処理し、NanoSeq による変異解析を行った。その結果、mutation frequency は対照群と同程度であり、用量依存的な増加は認められなかった。Trinucleotides mutation pattern においても、特定の塩基置換の増加は観察されず、全体として対照群と類似した変異パターンを示した (図6)。

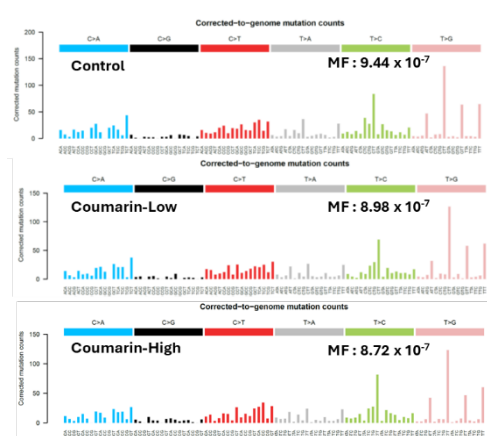


図6. オルガノイドにおける Coumarin の変異シグネチャー

⑦ マウス肝臓における Coumarin の変異シグネチャー

同様に、クマリンを投与したマウス個体の肝臓におい

ても、変異頻度および変異スペクトラムに顕著な変化は認められなかった (図7)。

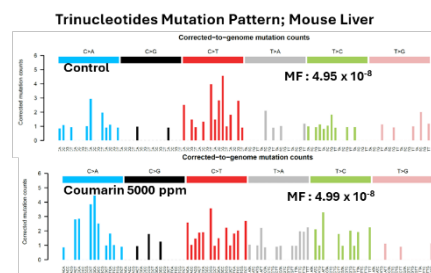


図7. マウス肝臓における Coumarin の変異シグネチャー

D. 考察

本研究では、マウス由来肝前駆細胞オルガノイドおよびマウス個体を用いて ec-NGS (NanoSeq) 解析を行い、Monocrotaline (MCT) に特異的な変異シグネチャーを検出した。一方で、EC の解析結果に示されるように、*in vivo* 条件では明確な変異誘導が観察されるにもかかわらず、オルガノイド系では同様の変異シグネチャーが検出されなかった。

この *in vitro-in vivo* 間の差異の一因として、オルガノイドにおける化学物質の曝露時間が相対的に短いことが影響している可能性が考えられる。本研究で用いたオルガノイド条件では、細胞生存性や培養維持を考慮し、比較的短期間の曝露時間を採用した。しかし、変異シグネチャーの形成は、DNA 損傷の蓄積、修復過程の反復、さらには細胞分裂を介した変異の固定化といった時間依存的プロセスを必要とするため、曝露時間が不十分な場合には変異導入が検出限界に達しない可能性がある。

したがって、今後はオルガノイドを用いた遺伝毒性評価において、曝露時間を延長した条件設定や、反復曝露の回数を検討する実験系の構築が重要になると考えられる。例えば、低濃度条件での長時間曝露や、培養時間の短縮により細胞毒性を抑制しつつ、変異蓄積を評価できる可能性がある。

E. 結論

MCT については、オルガノイドおよびマウス肝臓において C>A 変異の増加を伴う特徴的な変異シグネチャーが検出され、*in vitro* と *in vivo* で変異の増加が確認された。一方、EC では、マウス個体の肝臓において明確な変異頻度の増加が認められたのに対し、オルガノイド系では同様の変異誘導は検出されず、coumarin はオルガノイドとマウス個体、両者で変異の増加が観察されなかった。

EC における *in vitro* と *in vivo* の差異については、オルガノイド条件における曝露時間や回数が相対的に短かったことが影響している可能性が考えられる。これらの結果は、オルガノイドを用いた遺伝毒性評価において、曝露条件、特に曝露時間が変異シグネチャー形成に重要な因子であることを示唆している。

今後、曝露時間を含む実験条件の最適化を進めることで、本手法は次世代遺伝毒性評価法としての有用性をさらに高める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishigamori R., Ohno A., Fukuhara K., **Hasegawa S.**, Totsuka Y., Genotoxicity Assessment of Mesoporous Silica and Graphene Oxide in GDL1 Cells, Genes Environ. 2025 48 (1): 2.
2. Ando Y., Takeshima H., **Hasegawa S.**, Watanabe C., Hara-Kudo Y., Oku T. Dual regulation of coronin-1 expression by the core promoter and intronic regions. J Immunol. 2026 215(3):vkaf349.

2. 学会発表

1. 宮崎 飛翔, 石ヶ守 里加子, 長谷川 晋也, 藤岡正喜, 加藤 孝一, 美谷島 克宏, 戸塚 ゆ加里, マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規*in vitro*毒性試験法の開発, 第38回発癌病理研究会 (2025年8月、九十九里、千葉)
2. Yukari Totsuka¹, Momoko Nagai², Asmaa Elzawahari², Rikako Ishigamori¹, Shinya Hasegawa¹, Mamoru Kato, Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, EMGS2025 (2025年9月、ニューヨーク、米国)
3. 長谷川晋也、渡部光一、川口駿、垣内伸之、小川誠司、吉田健一、戸塚ゆ加里、加熱タバコ製品の吸入曝露による遺伝毒性と変異スペクトラム、第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
4. 宮崎 飛翔, 石ヶ守 里加子, 長谷川 晋也, 藤岡正喜, 加藤 孝一, 美谷島 克宏, 戸塚 ゆ加里, マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性試験法の開発, 第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
5. 長谷川 晋也, 石ヶ守 里加子, 大野 麻理奈, 吉田 健一, 垣内 伸之, 渡部 光一, 川口 駿, 小川 誠司, 戸塚 ゆ加里, ヒト胎児腎臓細胞株である 293 FT 細胞を用いたError-corrected NGSによる化学物質の変異シグネチャー解析, 第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
6. 長谷川 晋也, 石ヶ守 里加子, 高橋 賢吾, 遠藤 瑞葵, 戸塚 ゆ加里, ヒト胎児腎臓細胞株を用いたDNA損傷を指標とした化学物質の変異原性の評価, 日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪) .

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

3次元培養系と次世代シーケンサーによる
変異解析手法（ec-NGS）を組み合わせた化学物質の遺伝毒性評価法の開発
分担研究項目：オルガノイド、MPS モデルを用いた研究の国内外動向調査

研究分担者 山崎 大樹 ……………国立医薬品食品衛生研究所・第二室長

研究要旨

本分担研究では、三次元培養系と次世代シーケンサーによる変異解析手法、特に error-corrected next-generation sequencing (ec-NGS) を組み合わせた化学物質の遺伝毒性評価法の開発に資するため、生体模倣システム (microphysiological systems: MPS) の活用事例および国内外の研究・規制動向を調査した。MPS は、生体内の臓器・組織の微小環境を模倣し、生理機能を再現するマイクロスケールの細胞培養プラットフォームであり、動物実験代替、ヒト外挿性の向上、ニューモダリティーへの対応等の観点から、医薬品・化学物質の安全性評価における重要な new approach methodologies (NAMs) の一つとして期待されている。

本研究では、MPS World Summit 2025、EUROTOX 2025、ならびに MPS 実用化推進協議会学術シンポジウムを中心に、MPS 関連演題の動向を整理した。その結果、肝臓、消化管、腎臓、神経、心臓等を対象とした MPS・オルガノイド研究が多数報告され、特に肝臓領域では、DILI、MASH、代謝クリアランス、胆汁排泄、多臓器連結系など多様な応用が進んでいた。一方、遺伝毒性評価に MPS を直接適用した演題は限定的であり、EUROTOX 2025 では「遺伝毒性+MPS」に関する演題は確認されなかった。

具体的な先行事例として、Kopp らによる Liver-on-chip (LOC) を用いた遺伝毒性・変異原性評価論文を検討した。本論文は 2024 年 4 月 11 日にオンライン掲載され、PhysioMimix MPS を用いて、primary human hepatocytes (PHH) または HepaRG 細胞と肝類洞内皮細胞からなる肝 MPS に、ヒトリンパ芽球由来 TK6 細胞をトランズウェル上で共培養する試験系を構築していた。評価系では、肝細胞側のコメットアッセイ、TK6 細胞側の小核試験および Duplex Sequencing により、DNA 損傷、染色体異常、遺伝子変異の 3 つの遺伝毒性エンドポイントが解析された。被験物質として、直接遺伝毒性物質である methyl methanesulfonate および ethyl methanesulfonate、代謝活性化を要する cyclophosphamide および benzo[a]pyrene が用いられた。

Methyl methanesulfonate および ethyl methanesulfonate では複数のエンドポイントで陽性反応が確認され、cyclophosphamide では小核頻度および変異頻度の上昇が認められた。一方、benzo[a]pyrene ではコメットアッセイで DNA 損傷が検出されたものの、小核試験および Duplex Sequencing では明確な陽性反応が得られず、試験系のさらなる最適化が必要と考えられた。

以上より、肝 MPS は、ヒト肝代謝能を有する三次元培養環境下で、DNA 損傷、染色体異常、遺伝子変異を統合的に評価できる可能性を有しており、従来の S9 代謝活性化系や動物試験に依存した遺伝毒性評価を補完・代替する技術候補となり得る。一方で、化学物質ごとの感度差、代謝酵素活性の再現性、細胞種・ドナー差、用量反応性、長期・反復曝露条件、国際標準化に向けた妥当性確認などの課題も残されている。今後は、代表的な直接遺伝毒性物質および代謝活性化型遺伝毒性物質を用いた検証を進め、三次元培養系と ec-NGS を組み合わせたヒト外挿性の高い遺伝毒性評価法としての有用性を明確化する必要がある。

A. 研究目的

化学物質の遺伝毒性評価では、遺伝子突然変異、染色体構造異常および染色体数異常など、複数のエンドポイントを適切に評価する必要がある。しかし、既存の *in vitro* 試験系では、ヒト肝代謝能の再現が十分でない場合が多く、代謝活性化を要する化学物質の評価には、一般にラット肝由来 S9 などの外因性代謝活性化系が用いられてきた。この方法は簡便である一方、ヒト代謝との種差、S9 調製条件のばらつき、細胞毒性、長期曝露評価の困難さなどの課題を有する。

本研究の目的は、肝三次元培養系、MPS および ec-NGS を組み合わせた新たな遺伝毒性評価法の開発に向け、国内外における MPS の活用事例、研究動向、規制動向を調査し、遺伝毒性評価への応用可能性および今後の技術的課題を整理することである。特に、肝代謝を伴う遺伝毒性評価に焦点を当て、肝 MPS と TK6 細胞等を組み合わせ

た試験系が、DNA 損傷、染色体異常、突然変異を同一または連結した培養系で評価できるかを検討するため、関連文献および国際・国内学会情報を解析した。

B. 研究方法

本研究では、以下の方法により情報収集および解析を行った。

第一に、MPS World Summit 2025の演題情報を整理し、対象臓器、技術、用途、特に肝臓領域および遺伝毒性評価に関連する演題を抽出した。MPS World Summit 2025 は、2025年6月9日から13日にベルギー・ブリュッセルで開催された国際MPS学会であり、MPSの研究開発および社会実装に関する最新動向を把握するための主要な情報源とした。

第二に、EUROTOX 2025におけるMPS関連情報を確認し、毒性学領域におけるMPSおよび遺伝毒性評価の接点を調査した。EUROTOX 2025は2025年9月14日から17日にギリシャ・アテネで開催されたが、遺伝毒性とMPSを直接

出、CYP活性およびCYP遺伝子発現により、細胞の健康状態および代謝能が評価された。未処置条件下では、HepaRGおよびPHHのいずれのLOCにおいても細胞機能が維持され、CYP遺伝子発現および一部CYP活性が確認された。PHHとHepaRGでは、アルブミン産生、尿素産生、CYP発現・活性に差が認められ、細胞種の違いが代謝活性および遺伝毒性応答に影響し得ることが示唆された。

小核試験では、PHH-LOCおよびHepaRG-LOCの双方において、cyclophosphamide、methyl methanesulfonateおよびethyl methanesulfonateによる遺伝毒性が検出された。一方、benzo[a]pyreneについては、小核頻度の明確な上昇は認められなかった。コメットアッセイでは、benzo[a]pyrene、methyl methanesulfonateおよびethyl methanesulfonateによるDNA損傷が検出されたが、cyclophosphamideでは明確な%Tail DNA増加は確認されなかった。Duplex Sequencingでは、methyl methanesulfonateおよびethyl methanesulfonateによる変異頻度上昇が確認され、cyclophosphamideについても変異頻度上昇が認められた一方、benzo[a]pyreneの遺伝毒性は変異スペクトラム上では明確に検出されなかった。

遺伝毒性+MPS論文の紹介

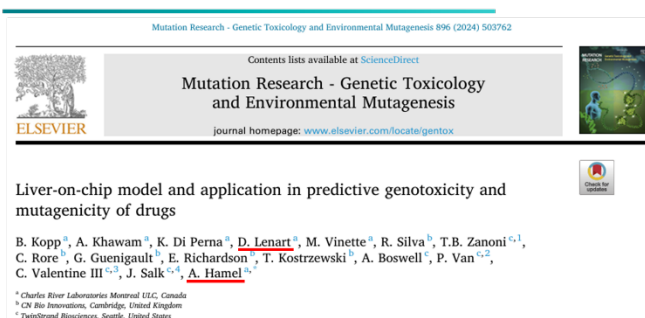


図3 遺伝毒性およびMPS論文の紹介

D. 考察

本調査により、MPSは、ヒト細胞を用いた三次元的かつ動的な培養環境を提供することで、従来の二次元培養系では再現困難であった肝代謝能、細胞間相互作用、長期曝露条件を評価系に組み込める可能性が示された。特に遺伝毒性評価では、代謝活性化を要する化学物質の評価が重要であり、肝MPSはS9代謝活性化系の限界を補完するヒト関連性の高い試験系となり得る。

KoppらのLiver-on-chip事例は、同一のMPSシステム上で、DNA損傷、染色体異常、遺伝子変異という遺伝毒性評価に必要な複数エンドポイントを組み合わせる点で重要である。特に、Duplex Sequencingを用いることで、従来のレポーター遺伝子や選択培養に依存せず、低頻度の塩基置換変異を高感度に検出できる可能性が示された。この点は、本研究課題で目指す三次元培養系とec-NGSを組み合わせた遺伝毒性評価法の開発方針と整合する。

一方で、同試験系には課題も認められた。benzo[a]pyreneではコメットアッセイで陽性応答が認められたものの、小核試験およびDuplex Sequencingでは明確な陽性応答が得られず、代謝活性化物質に対する検出感度は化合物およびエンドポイントにより異なる可能性が示された。また、CYP活性、特にcyclophosphamideの代謝に関与するCYP2B6活性の検出性、PHHとHepaRGの機能差、曝露濃度、曝露期間、

細胞生存率、DNA修復能、用量反応性など、試験条件の最適化が必要である。

今後、MPSを遺伝毒性評価法として一般化し、将来的な国際標準化やOECDテストガイドライン化を目指すためには、代表的な直接遺伝毒性物質、代謝活性化型遺伝毒性物質、非遺伝毒性物質を含む標準化合物パネルを用いた多施設検証が必要である。また、MPSで得られた結果を、既存の*in vitro*試験、*in vivo*試験、ヒト肝キメラマウス等の代謝能を有する動物モデルの結果と比較し、感度、特異度、再現性、ヒト外挿性を評価する必要がある。本研究では、MPS World Summit等の演題分析結果を研究へ還元し、一般化・国際標準化を経て、将来的にOECDテストガイドライン化を目指す。

E. 結論

結論として、肝MPSとec-NGSを組み合わせた遺伝毒性評価法は、ヒト代謝を考慮した新しいNAMとして有望である。現時点では、遺伝毒性評価へのMPS応用例は限定的であり、技術的・標準化上の課題も残されているが、国内外の規制動向およびMPS研究の進展を踏まえると、本領域は今後重要性が高まると考えられる。本研究で得られた動向調査結果および先行事例の解析は、三次元培養系とec-NGSを組み合わせた次世代型遺伝毒性評価法の開発に向けた基盤情報となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. Yamazaki D, Horiuchi S, Ikeda Y, Shinha K, Koda N, Masuo Y, Kimura H, Kato Y. Evaluation of drug-induced cardiotoxicity via hepatic metabolism in a perfusing liver-heart microphysiological system. EUROTOX2025, 2025/9, ポスター発表

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
Ishigamori R., Ohno A., Fukuhara K., Hasegawa S., Totsuka Y.	Genotoxicity Assessment of Mesoporous Silica and Graphene Oxide in GDL1 Cells	Genes & Environment	48 (1)	2	2025
Betsuyaku Y., Motohashi M., Sassa A., Takamura-Enya T., Totsuka Y.	Analysis of Novel DNA Adducts Derived from Acetaldehyde	Biomolecules	15(6)	878	2025
Ando Y., Takeshima H., Hasegawa S., Watanabe C., Hara-Kudo Y., Oku T.	Dual Regulation of Coronavirus-1 Expression by the Core Promoter and Intronic Regions	Journal of Immunology	215(3)	349	2026

令和8年 5月 21日

国立医薬品食品衛生研究所) 殿

機関名 東京農業大学
所属研究機関長 職 名 学長
氏 名 江口 文陽

次の職員の令和7年度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
2. 研究課題名 3次元培養系と次世代シーケンサーによる変異解析手法(ec-NGS)を
組み合わせた化学物質の遺伝毒性評価法の開発 (25KD1001)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 応用生物科学部 食品安全健康学科 教授
(氏名・フリガナ) 美谷島 克宏・ミヤジマ カツヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 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	☒	東京農業大学	☐
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:)	☐ 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。

令和8年 5月 26日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 星薬科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 牛島 俊和

次の職員の令和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 3次元培養系と次世代シーケンサーによる変異解析手法(ec-NGS)を組み合わせた化学物質の遺伝毒性評価法の開発(25KD1001)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学部・教授
(氏名・フリガナ) 戸塚 ゆ加里 (トツカ ユカリ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	☐ ☒	☐		☐
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	☐ ☒	☐		☐
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:)

(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5月19日

国立医薬品食品衛生研究所 殿

機関名 公益財団法人実中研

所属研究機関長 職 名 代表理事

氏 名 野村 龍太

次の職員の令和7年度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 3次元培養系と次世代シーケンサーによる変異解析手法(ec-NGS)を組み合わせた化学物質の遺伝毒性評価法の開発（25KD1001）
3. 研究者名（所属部署・職名） ヒト化モデル研究部 ヒト臓器/組織モデル研究室・室長
（氏名・フリガナ） 樋口 裕一郎・ヒグチ ユウイチロウ

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	☒	公益財団法人実中研・動物実験委員会	☐
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：遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律）	☒ 有 ☐ 無	☒	公益財団法人実中研・遺伝子組換え実験安全委員会	☐

（※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。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 星薬科大学
所属研究機関長 職 名 学長
氏 名 牛島 俊和

次の職員の令和7年度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 3次元培養系と次世代シーケンサーによる変異解析手法(ec-NGS)を組み合わせた化学物質の遺伝毒性評価法の開発 (25KD1001)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学部・講師
(氏名・フリガナ) 長谷川 晋也・ハセガワ シンヤ

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。

令和8年5月21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
2. 研究課題名 3次元培養系と次世代シーケンサーによる変異解析手法(ec-NGS)を
組み合わせた化学物質の遺伝毒性評価法の開発 (25KD1001)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター薬理部・第二室長
(氏名・フリガナ) 山崎大樹・ヤマザキダイジュ

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。