

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

リスク評価に向けた DynaLux/c の改良

研究分担者 大久保 佑亮 国立医薬品食品衛生研究所

研究分担者 福田 淳二 横浜国立大学

研究要旨

化学物質が胚・胎児発生に及ぼす影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験を通じてヒトへの外挿性を高める手法が取られてきた。しかし、このような試験系は高コストであり、動物福祉の観点からも動物実験の代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは極めて困難であり、現在のところ実用に耐える in vitro 試験系は確立されていない。これまで我々は、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に着目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基に発生毒性を評価する DynaLux/c を開発してきた。DynaLux/c は動物を用いた従来の発生毒性試験とは概念的に異なる細胞ベースの試験法であり、高い正確性と網羅性を有するだけでなく、96 穴プレートを用いて一週間程度で実験を完了できるため、高スループットかつ低コストという特徴を持つ。しかしながら、現在の段階ではハザード評価が主眼であり、化審法などの行政判断に必要なリスク評価に用いるには、毒性強度を定量評価できる指標を取得する必要がある。

本研究の目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM (New Approach Method) を確立するとともに、公定化を目指すことである。具体的には、定量的な有害性評価指標を得る仕組みを構築し、将来的に OECD テストガイドライン(TG)として承認されるように研究を推進する。

本分担研究では、DynaLux/c にリアルタイム発光測定装置(KronosHT)を導入し、70 時間以上の連続した FGF シグナルのかく乱作用を計測した。溶媒対照に対する化学物質のシグナルかく乱面積を Area Between the Curve (ABC)として化学物質のシグナルかく乱の指標として用いた。陽性および陰性対照物質を評価した結果、陽性対照物質 14 種類、陰性対照物質 5 種類を 100%の正確度で分類することが可能であった。また、陽性対照物質の約 8 割で用量依存的な反応が確認され、DynaLux/c を基盤としたリスク評価指標の構築が可能であることが示唆された。

また、コンソーシアムの参加機関への技術移転を目的として標準作業手順書(Standard Operating Procedure: SOP)を作成した。この SOP はコンソーシアム参加者に配布され、DynaLux/c の導入に関する意見が収集された。

A. 研究目的

化学物質による胚・胎児発生への影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。

そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験によってヒトへの外挿性を高めてきた。しかしながら、このような試験系

は高コストであるうえに、動物福祉の観点からも動物実験代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは非常に困難であり、現在のところ実用に耐える in vitro 試験系は確立されていない。

そこで、我々は、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に注目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基盤とした発生毒性評価法「DynaLux/c」を開発してきた (*iScience* 等)。DynaLux/c は、動物を用いた従来の発生毒性試験とは概念的に異なる細胞ベースの試験法であり、高い正確性と網羅性を有するだけでなく、96 穴プレートを用いて一週間程度で実験を完了できるため、高スループットかつ低コストという特徴を持つ。しかしながら、現在の段階ではハザード評価が主眼であり、化審法などの行政判断に必要なリスク評価に用いるには、毒性強度を定量評価できる指標を取得する必要がある。

本研究の目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM (New Approach Method) を確立するとともに、公定化を目指すことである。具体的には、定量的な有害性評価指標を得る仕組みを構築し、OECD テストガイドライン (TG) として承認されるように研究を推進する。化審法の審査においては、一般毒性 (28 日間反復投与毒性) に加えて生殖発生毒性試験や発がん試験の情報が要求されるが、GLP 準拠の発生毒性試験や発がん試験は高コストかつ長期間を要するため、既存情報が十分に整っているとは言い難い。そのため、低コスト・短時間で信頼性の高い生殖発生毒性情報を提供可能な試験法の開発が強く望まれている。

本研究では、発生毒性評価の専門家 (桑形麻樹子)、公定化に関する専門家 (平林容子: JaCVAM)、業界団体および国際的な合意形成に関わる専門家 (小島肇: 日化協 LRI 顧問) らが連携し、さらに産業技術総合研究所の佐々木大輔

博士 (若手) や横浜国立大学の Seo Jieun 博士 (若手・女性・国際性) などを含む研究体制を構築する。こうした専門知識を融合させることで、DynaLux/c の有害性評価値の導出を可能にし、最終的にはリスク評価が可能な in vitro 生殖発生毒性代替法として確立することを目指す。

この新たな試験法が公定化されれば、行政判断に必要な有害性データを効率的に取得できるようになり、動物実験の削減や審査コストの軽減につながるだけでなく、新規化学物質の適切なリスク管理の下での迅速な上市を促進することが期待される。さらに、化学産業や規制当局における国際競争力を強化し、産業界のイノベーションを支えながら社会の持続的発展に寄与する可能性がある。

本分担研究では、DynaLux/c をリスク評価可能な系に改するために、リアルタイムルシフェーラスアッセイ並びにその解析方法の構築を目的とする。

B. 研究方法 DynaLux/c の概要

DynaLux/c は発生生物学の観点から発生毒性評価を試みた NAM である。受精卵から胎児に至るまでの複雑な形態形成は、細胞の増殖・分化・相互作用などを介し、適切に制御されている。加えて、偶発的な細胞死や遺伝子発現などの内因性、及び化学物質曝露のような外因性のノイズに対する抵抗性もまた適切な発生には重要である。これまでの研究から、形態形成とノイズ抵抗性はシグナル伝達の相互作用により連結され、発生過程を制御していることが明らかになっている (図 1a)。

動物試験では、主に胎児の形態異常を基に化学物質の毒性を評価している (図 1b)。その毒性機序を考えると、化学物質がシグナル伝達相互作用をかく乱し、その結果として生じた形態異常を観察していると考えられる (図 1c)。そこで我々は、このシグナル伝達相互作用のかく乱を計測するこ

発生毒性評価法のNAMであるDynaLux/c

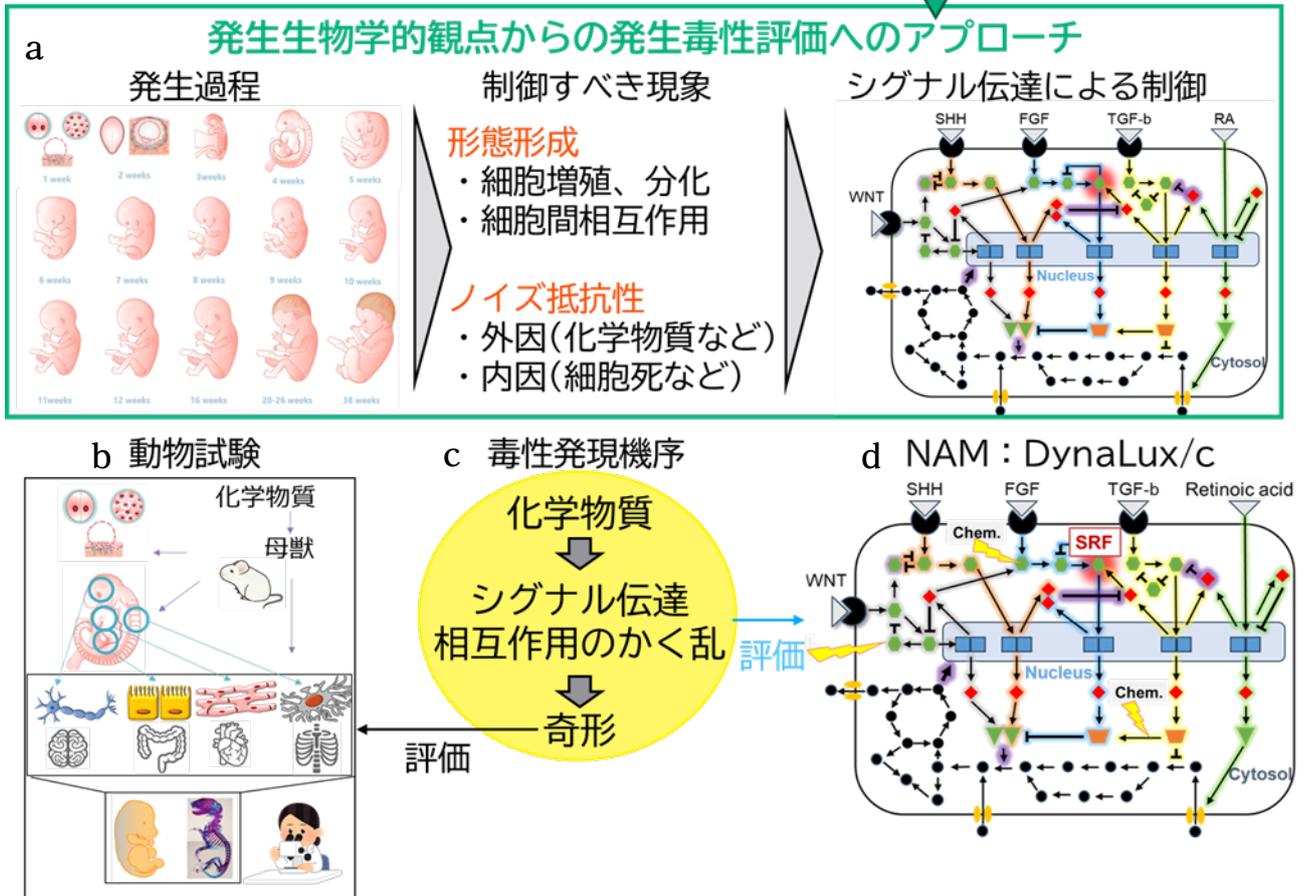


図 1: 発生毒性評価における動物試験と DynaLux/c の比較

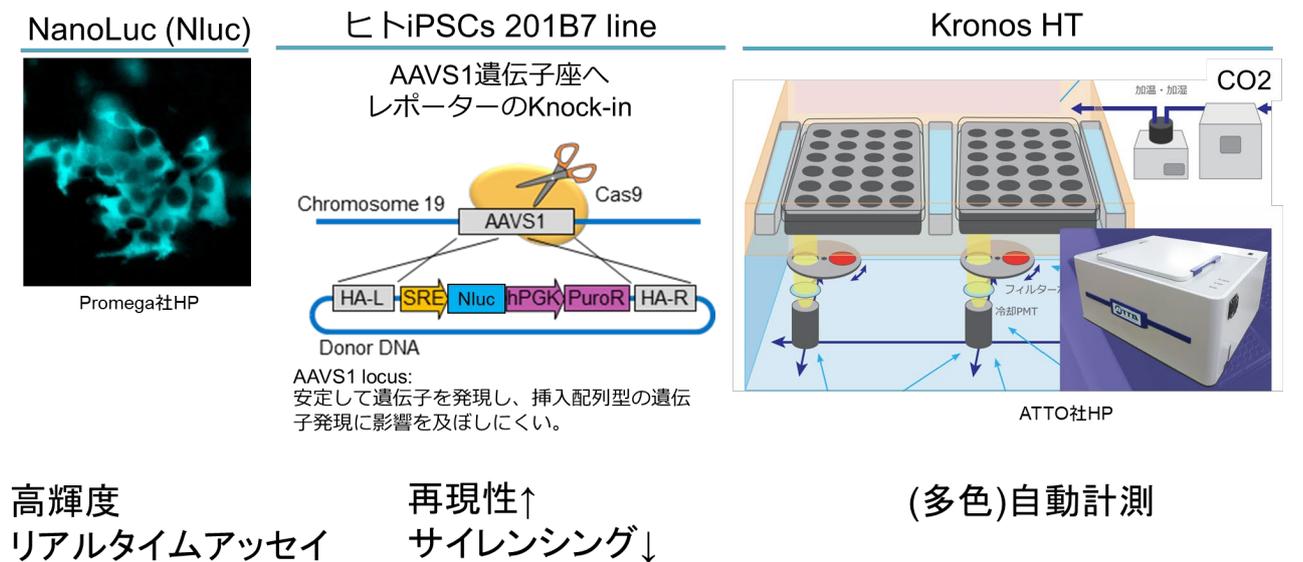


図 2: ヒト iPS 細胞を用いたリアルタイムルシフェーラスアッセイ

とで発生毒性を予測できると考え、リアルタイムルシフェーラスアッセイを用いたレポーターア

ッセイを確立した。これまでに、ヒト iPS 細胞を用いて 5 種類 (FGF シグナルは 2 種類、WNT シ

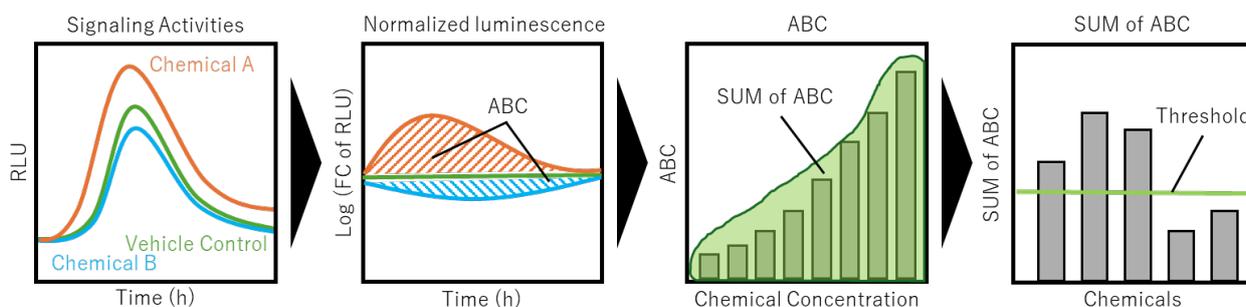


図 3: DynaLux/c によるシグナルかく乱作用の数値化

グナル、BMP シグナル、TGF- β シグナルは各 1 種類) のレポーター系を樹立した。各レポーターとリガンドの組合せを検討し、レポーターの反応性を確認した。その中で、最も発光強度が強くシグナルかく乱に対する感度が高い、FGF シグナルレポーターのうち血清応答因子 (Serum Response Factor: SRF) のレポーターアッセイ系を選定した(図 1d)。その特徴は、代表的なホタルルシフェラーズに比べ約 100 倍明るく iPS 細胞での生細胞ルシフェラーズアッセイが可能な Nluc を発光レポーターとして用いたことである。また、培養をしながらリアルタイム発光計測が可能なリアルタイム発光測定装置(Kronos HT)を組み合わせることで、細胞播種から試験終了まで 1 週間で終了するハイスループットな試験系を構築した(図 2)。

実際のシグナルかく乱試験は、レポーターヒト iPS 細胞を 96 穴プレートに播種しコンフルエントになるまで培養する。その後、試験物質を最高溶解度もしくは IC50 以下の濃度を最高濃度として 1/2 ずつ希釈した 8 段階の濃度を培地に適用し、72 時間以上リアルタイムルシフェラーズアッセイを行う。化学物質のシグナルかく乱作用を比較するために、溶媒対照群に対する試験物質のシグナルかく乱面積(Area between the curve: ABC)を各濃度で求め、それらの和をシグナルかく乱作用の値とした(SUM of ABC)。ROC 解析により閾値を設定し、発生毒性陽性と陰性を分類する(図 3)。

B-1. DynaLux/c による発生毒性物質のハザード評価並びに特性解析。標準作業手順書 (Standard Operating Procedure: SOP) の作成

DynaLux/c の特性を把握するために既存の発生毒性物質を用いたハザード評価を行った。既存の発生毒性物質として、これまでに陽性対照物質 14 種(サリドマイド(THA)、バルプロ酸ナトリウム(VPA)、メトトレキサート(MTX)、レナリドミド(Len)、メトキシ酢酸(MAA)、サリチル酸ナトリウム(SA)、ヒドロキシウレア(HU)、レチノール(RA)、ホウ酸(BA)、フルオロウラシル(5FU)、塩化リチウム(LiCl)、ブロモデオキシウリジン(BrdU)、5,5-ジメチル-2,4-オキサゾリジンジオン(DMO)、ジフェンヒドラミン(DHM))、陰性対照物質 5 種(ペニシリン(PenG)、サッカリン(SAC)、シメチジン(CM)、D-カンファー(CAM)、ジフェンヒドラミン(DMP))を評価した(表 1)。

また、コンソーシアムの参加機関への技術移転を目的として SOP を作成した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究成果および考察

SOP の作製にあたっては、試験の再現性と信頼性を確保するため、以下の検討を行った。まず、播種細胞数および培養スケジュールについては、日単位・時間単位での厳格な管理を実施した。次に、96 穴プレートにおけるエッジ効果の抑制を

目的として、外周ウェル間に滅菌水を注入し、また、培養時には従来の蓋の代わりにガス透過性シール(ブリーズイージー、ブリーズイジアー)を用いることで湿度の安定化を図った。さらに、細胞培養中の温度を一定に保つための運用方法を確認した。加えて、施設内における実施環境のバリデーションを通じて、試験実施上の課題の抽出と対策を行った。その結果、複数の実験者において、再現性の高い波形データが得られるようになり、Well間の差も減少した(図4)。作成したSOPは、本報告書内のその他として公開する。

作成したSOPに準拠して、DynaLux/cを用いた化学物質のシグナルかく乱作用の測定を実施した。評価に用いた化学物質、使用溶媒、試験濃度、および判定の正誤については表1に示す。また、評価物質を用いたリアルタイム FGF-SRF シグナルルシフェレースアッセイの結果を図5、図6、図7に示す。陽性対照物質ではシグナルが増強又は抑制されていた。物質毎の毒性強度を明らかにするために、標準化したグラフ及びその各濃度のかく乱面積(Area between the curve: ABC)を求めた(図8、図9)。陰性対照物質はほとんどシグナルをかく乱しない一方で、発生毒性陽性物質は、物質毎に異なるシグナルかく乱パターンを示した。これらのABCの和(SUM of ABC)から閾値を設定し、陽性対照物質14種と陰性対照物質5種を100%の正確度で分類することに成功した(図10、図11)。

次に、各評価物質の用量相関に着目した。陰性対照物質では用量相関は見られず、ABCの値も低いことが明らかになった。陽性対照物質のうち、サリドマイド、レナリドミド、メトトレキサートは用量相関性を示さなかったが、他の11物質では用量相関性が確認された。現在は、最高用量から1/128希釈までの範囲を試験しており、今後は試験の濃度範囲を広げる必要があるかもしれない。ただし、用量相関がみとめられなかった3物質の最高試験濃度は溶解度に依存しており、溶

けにくい物質の評価は今後の課題となる。これらは今後のデータの集積を待って判断する。

最後にこれまでのデータからABCの値に関して考察した。陰性対照物質ではほとんどの濃度でABCは50以下であった。一方で、陽性対照物質では用量相関を示すものはABCの値が100程度を超えるとABCの値が急激に増強される傾向がみられた。用量相関を示さない3物質のABCはどの濃度でも100前後であった(図10)。これらの結果はDynaLux/cにおいても、Point of Departure (PoD)の設定が可能かもしれないことを示唆している。今後のデータの集積を待ち、班員やコンソーシアムのメンバーと協議しながら、IVIVEを考慮したリスク評価への道筋をつけ、公定化に向けた協議を続ける。

D. 結論

本研究は、DynaLux/cを改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たなNAMを確立するとともに、公定化を目指すことである。

今年度の研究の成果として、陽性および陰性対照物質に基づき、Kronos HTを用いた70時間以上のリアルタイムルシフェレース計測を実施し、シグナルかく乱作用を定量的に評価する指標(ABC)を確立した。ABCを用いた解析では、陽性対照物質と陰性対照物質の正確な分類が可能であることから、DynaLux/cの有用性を示した。また、用量-応答関係の解析において、8割の陽性対照物質で用量依存性が確認された。これにより、DynaLux/cの結果を基にリスク評価指標を構築するための道筋が示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 西村拓也, 直田みさき, 大久保佑亮, 平林容子. ICH S6 バイオ医薬品の非臨床安全性評価の見直しについて 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2024, 55, 423-425

2. Y. Okubo, Y. Hirabayashi, J. Fukuda. Advances in Genomic Toxicology: In vitro Developmental Toxicity Test based on Signal Network Disruption Dynamics. Current Opinion in Toxicology 2024; Volume 39, 100489.
 3. T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, and J. Fukuda, Effects of oxytocin receptor agonists on hair growth promotion, Scientific Reports (IF=3.8), 14, 23935 (2024)
 4. T. Kageyama, J. Seo, L. Yan, and J. Fukuda, Cinnamic acid promotes elongation of hair peg-like sprouting in hair follicle organoids via oxytocin receptor activation, Scientific Reports (IF=3.8), 14, 4709 (2024) doi.org/10.1038/s41598-024-55377-y
 5. MT. Taninokuchi, Y. Zhou, L. Braccischi, F. Modestino, J. Fukuda, C. Mosconi, Trans-arterial stem cell injection (TASI): The role of interventional radiology in regenerative medicine. Journal of Clinical Medicine (IF= 3.0) 13(3), 910 (2024) doi.org/10.3390/jcm13030910
 6. JB Park, GH Moon, A Cho, M Kwon, JW Park, EC Yi, H Kim, J. Fukuda, C Kwak, YG Ko, and YS Chun, Neddylation of insulin receptor substrate acts as a bona fide regulator of insulin signaling and its implications for cancer cell migration, Cancer Gene Therapy (IF= 4.8), 31, 599-611 (2024) doi.org/10.1038/s41417-024-00729-z
 7. E. Sugiyama, A. Nanmo, N. Xiaolei, SY. Chang, M. Hashimoto, A. Suzuki, T. Kageyama, J. Fukuda, Large-scale preparation of hair follicle germs using a microfluidic device, ACS Biomaterials Science & Engineering (IF=5.4), 10, 2, 998-1005 (2024) doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c01346
 8. Y. Zhou, J. Seo, S. Tu, A. Nanmo, T. Kageyama, and J. Fukuda, Exosomes for hair growth and regeneration, Journal of Bioscience and Bioengineering (IF=2.3), 137, 1, 1-8 (2024) doi.org/10.1016/j.jbiosc.2023.11.001
- 2.学会発表**
1. Yusuke Okubo, Kasu Mizota, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda: in vitro developmental toxicity testing based on real-time monitoring for signal disruption. EUROTOX 2024, Copenhagen, Denmark, (Sep. 9th, 2024).
 2. Yusuke Okubo, Kasu Mizota, Rintaro Ohara, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda: Developmental toxicity testing in human iPS cells through disruption of signal interaction. The 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Jun. 19, 2024. Kyoto.
 3. 大久保 佑亮、溝田 華柊、大原 凜太郎、松浦 利絵子、平林 容子、中島 芳浩、福田 淳二：リアルタイム発光法を用いたシグナルかく乱を基にした in vitro 発生毒性評価法の開発。第 64 回日本先天異常学会学術集会 (2024 年 7 月 27 日) 東京
 4. 大久保佑亮：シグナルかく乱作用を基にした in vitro 発生毒性試験法の開発とその検出機構の解明に向けて。第 51 回日本毒性学会学術年会。2024 年 7 月 3 日

5. 大久保佑亮：生殖発生毒性試験代替法の in vitro 発生毒性試験法について. 2023 年度安研協定期総会及び講演会. 2024 年 11 月 8 日
6. Rieko Matsuura, Rintaro Ohara, Kashi Mizota, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda, Yusuke Okubo: Developmental Toxicity Assessment Using Human iPSCs Based on the Wnt Signal Disruption. 第 51 回日本毒性学会学術年会. 2024 年 7 月 3 日
7. Kashu Mizota, Rintaro Ohara, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Yusuke Okubo, Junji Fukuda: Developmental Toxicity Assessment Using Human iPSCs by Automated Measurement of FGF Signaling Disruption. 58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024.9.9)
8. 三ヶ島史人、真木一茂、小島肇、栗形麻樹子、大久保佑亮、星野裕紀子、片桐龍一、石黒司、渡部一人、角崎英志、下村和裕:医薬品の生殖発生毒性試験及び生殖発生毒性評価代替法に係る状況調査. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月 3 日)
9. 溝田華柊、大原凜太郎、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二：ヒト iPSC 細胞を用いた FGF シグナルかく乱の自動測定による発生毒性評価. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月 3 日)
10. 村山航己、溝田華柊、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二：ヒト iPSC 細胞を用いたシグナルかく乱作用を基にした発生毒性評価法における補完的なシグナル経路の検討. 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 宇都宮
11. 溝田華柊、村山航己、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二：ヒト iPSC 細胞を用いた FGF シグナルかく乱作用の自動測定による発生毒性評価. 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 宇都宮
12. 溝田華柊、村山航己、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二：ヒト iPSC 細胞を用いた FGF シグナルかく乱を指標とした発生毒性評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2024 仙台

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

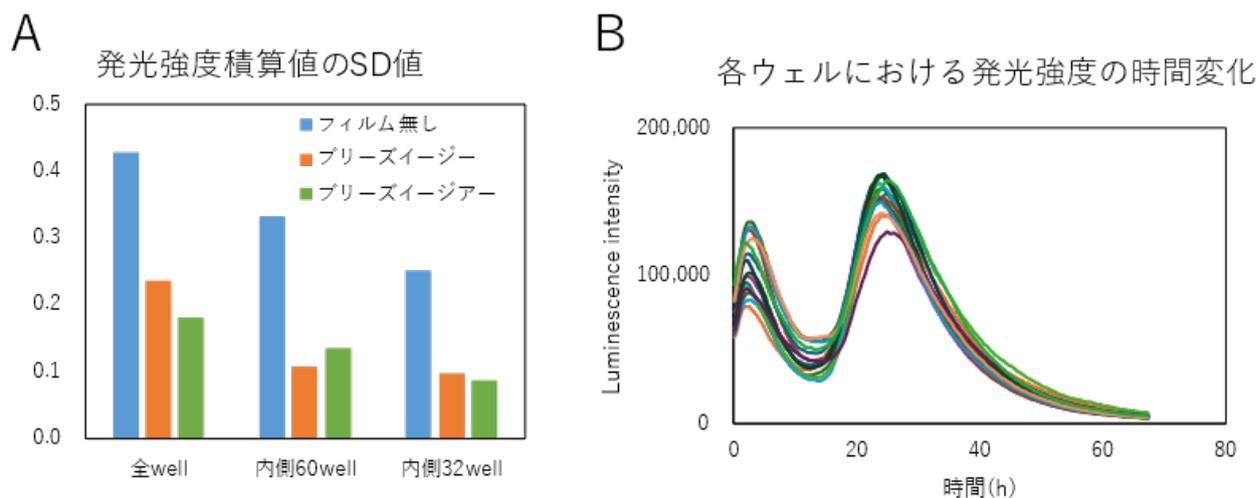


図4：ウェル間の発光強度の差

(A) 各条件における発光強度積算値の平均を1とした時のSD値

(B) 内側60wellかつBreeze-EASIERを使用した際の各ウェルの発光強度の時間変化

表1：評価物質リスト

	名前	CAS No.	溶媒	最高濃度(ug/mL)	判定の正誤
1	陽性物質 サリドマイド(THA)	50-35-1	DMSO	12	正
2	陽性物質 バルプロ酸ナトリウム(VPA)	99-66-1	DMSO	100	正
3	陽性物質 メトトレキサート(MTX)	133073-73-1	DMSO	5	正
4	陽性物質 レナリドミド(LEN)	191732-72-6	DMSO	35	正
5	陽性物質 メキシ酢酸(MAA)	625-45-6	PBS	683	正
6	陽性物質 サリチル酸ナトリウム(SA)	54-21-7	PBS	666	正
7	陽性物質 ヒドロキシウレア(HU)	127-07-1	PBS	149	正
8	陽性物質 レチノール(RA)	302-79-4	DMSO	0.01	正
9	陽性物質 ホウ酸(BA)	10043-35-3	PBS	250	正
10	陽性物質 フルオロウラシル(5FU)	51-21-8	DMSO	14.1	正
11	陽性物質 塩化リチウム(LiCl)	7447-41-8	PBS	250	正
12	陽性物質 プロモデオキシウリジン(BrdU)	59-14-3	DMSO	50	正
13	陽性物質 5,5-ジメチル-2,4-オキサゾリジンジオン(DMO)	695-53-4	PBS	840	正
14	陽性物質 ジフェンヒドラミン(DHM)	147-24-0	PBS	262	正
15	陰性物質 ペニシリン(PenG)	69-57-8	PBS	1000	正
16	陰性物質 サッカリン(SAC)	82385-42-0	PBS	1000	正
17	陰性物質 シメチジン(CM)	51481-61-9	DMSO	30	正
18	陰性物質 D-カンファー(CAM)	464-49-3	DMSO	50	正
19	陰性物質 ジフェンヒドラミン(DMP)	147-24-0	PBS	262	正

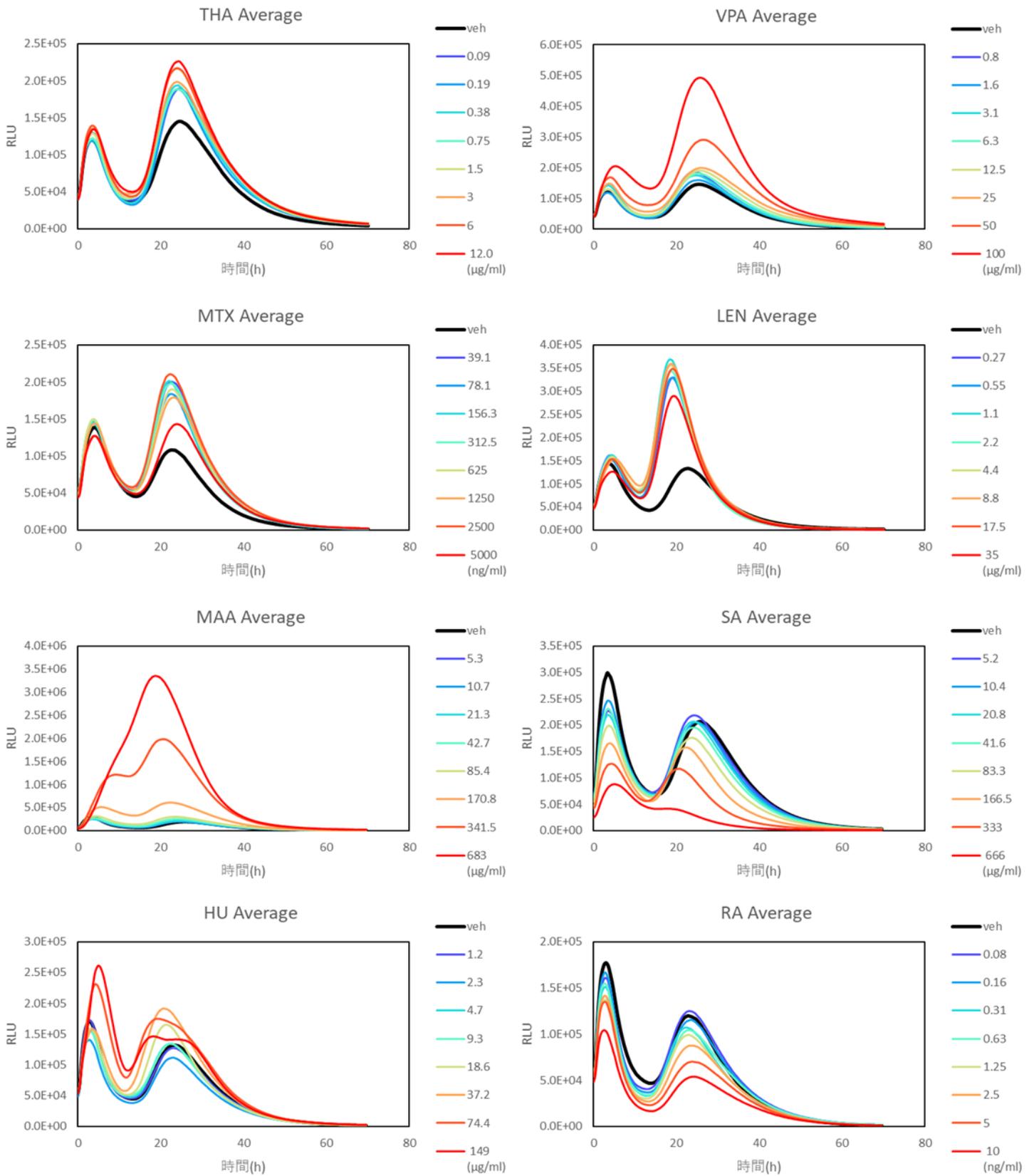


図5：リアルタイム FGF-SRF シグナルルシフェーセンスアッセイ（陽性対照物質-1）
 サリドマイド(THA)、バルプロ酸ナトリウム(VPA)、メトトレキサート(MTX)、レナリドミド
 (LEN)、メトキシ酢酸(MAA)、サリチル酸ナトリウム(SA)、ヒドロキシウレア(HU)、レチノール
 (RA)

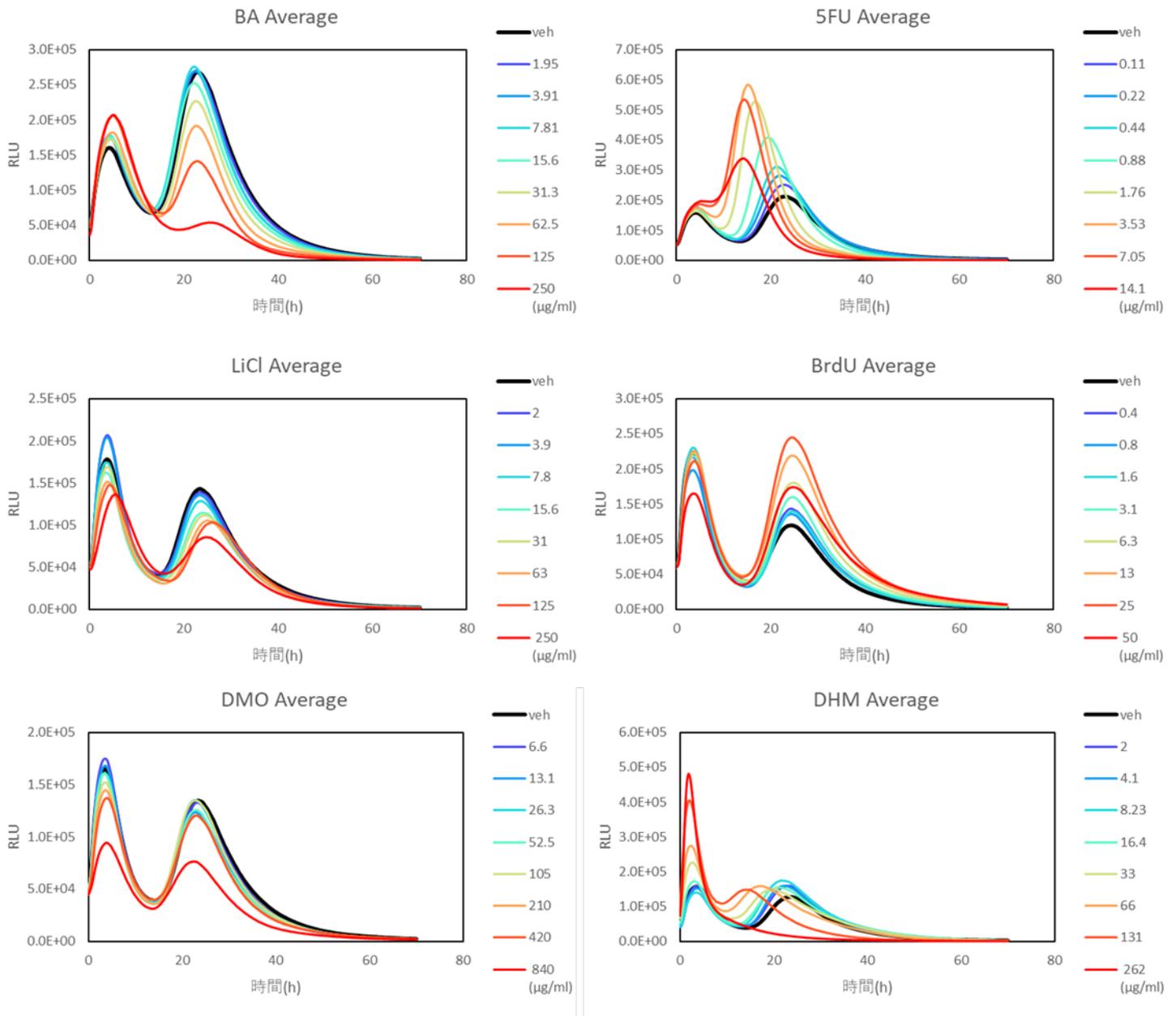


図6：リアルタイム FGF-SRF シグナルルシフェランスアッセイ（陽性対照物質-2）
 ホウ酸(BA)、フルオロウラシル(5FU)、塩化リチウム(LiCl)、ブロモデオキシウリジン(BrdU)、5,5-ジメチル-2,4-オキサゾリジンジオン(DMO)、ジフェンヒドラミン(DHM))

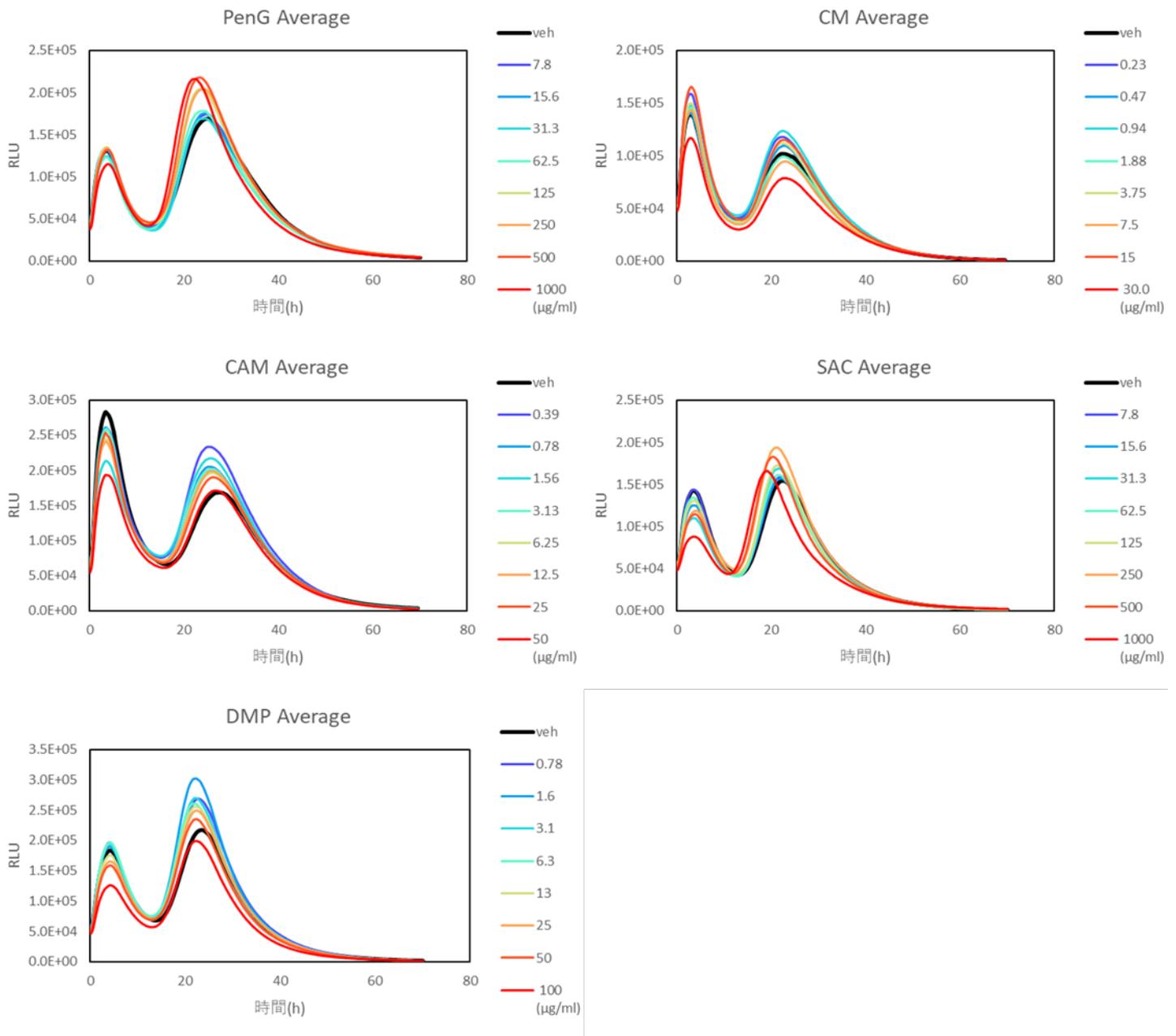


図7：リアルタイム FGF-SRF シグナルルシフェレーズアッセイ（陰性対照物質）
 陰性対照物質 5 種（ペニシリン(PenG)、シメチジン(CM)、D-カンファー(CAM)、サッカリン(SAC)、ジフェンヒドラミン(DMP)）。

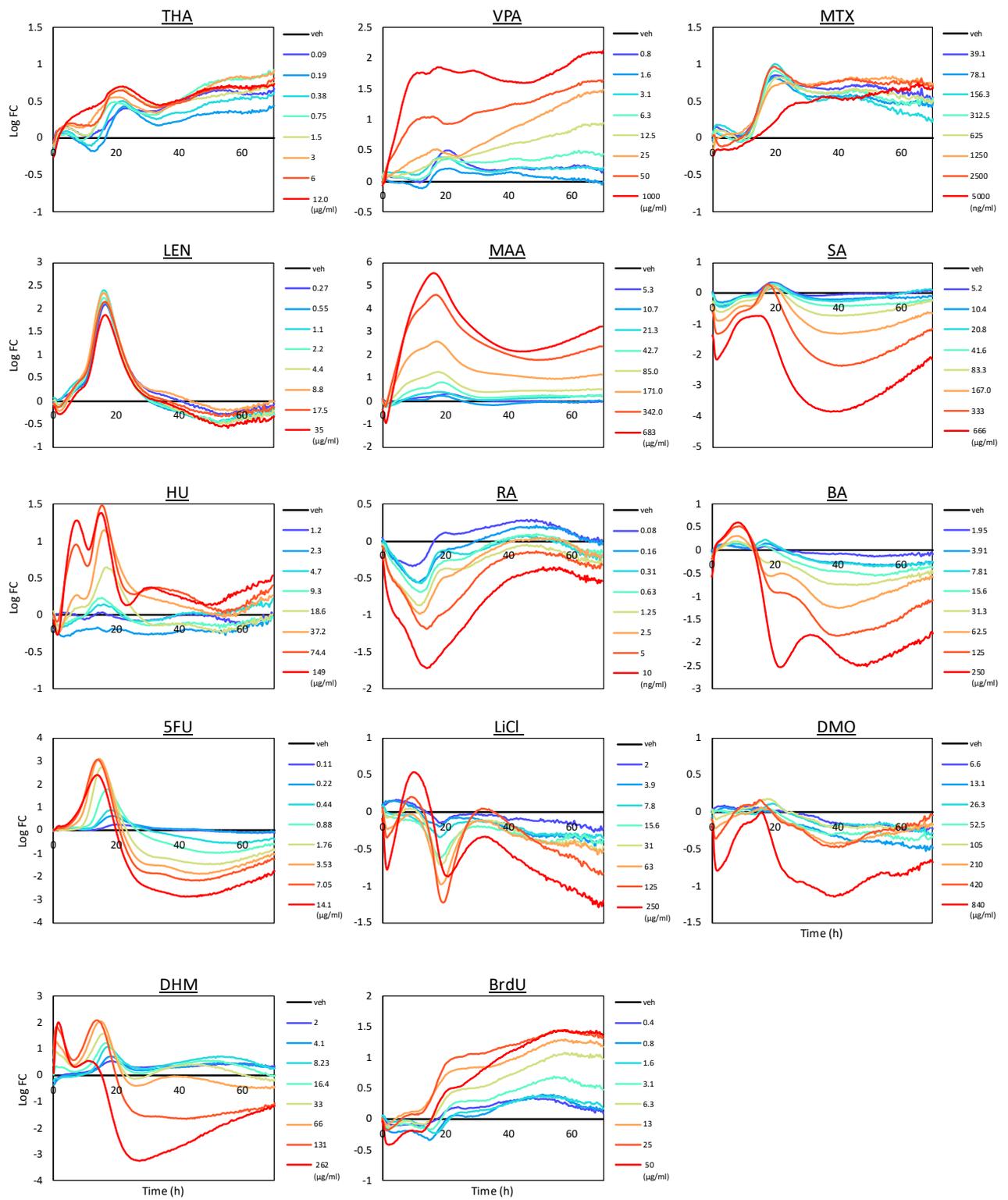


図 8: 各陽性対照物質暴露時の溶媒対照と比較した発光強度の変化比率(ABC)

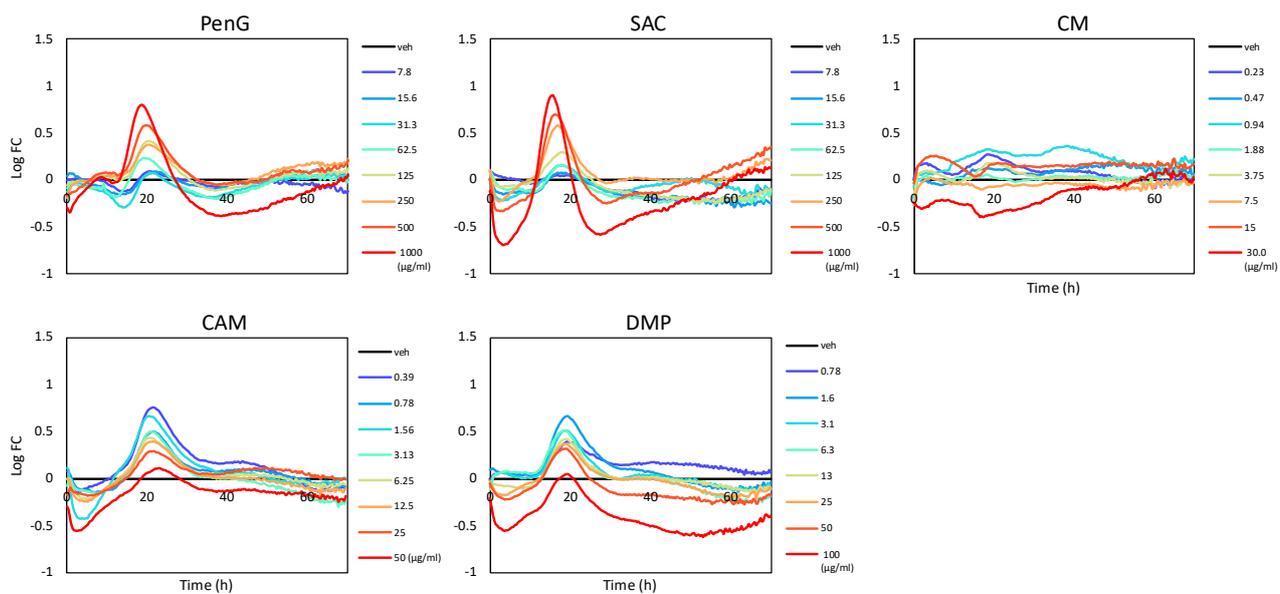


図 9:各陰性対照物質暴露時の溶媒対照と比較した発光強度の変化比率(ABC)

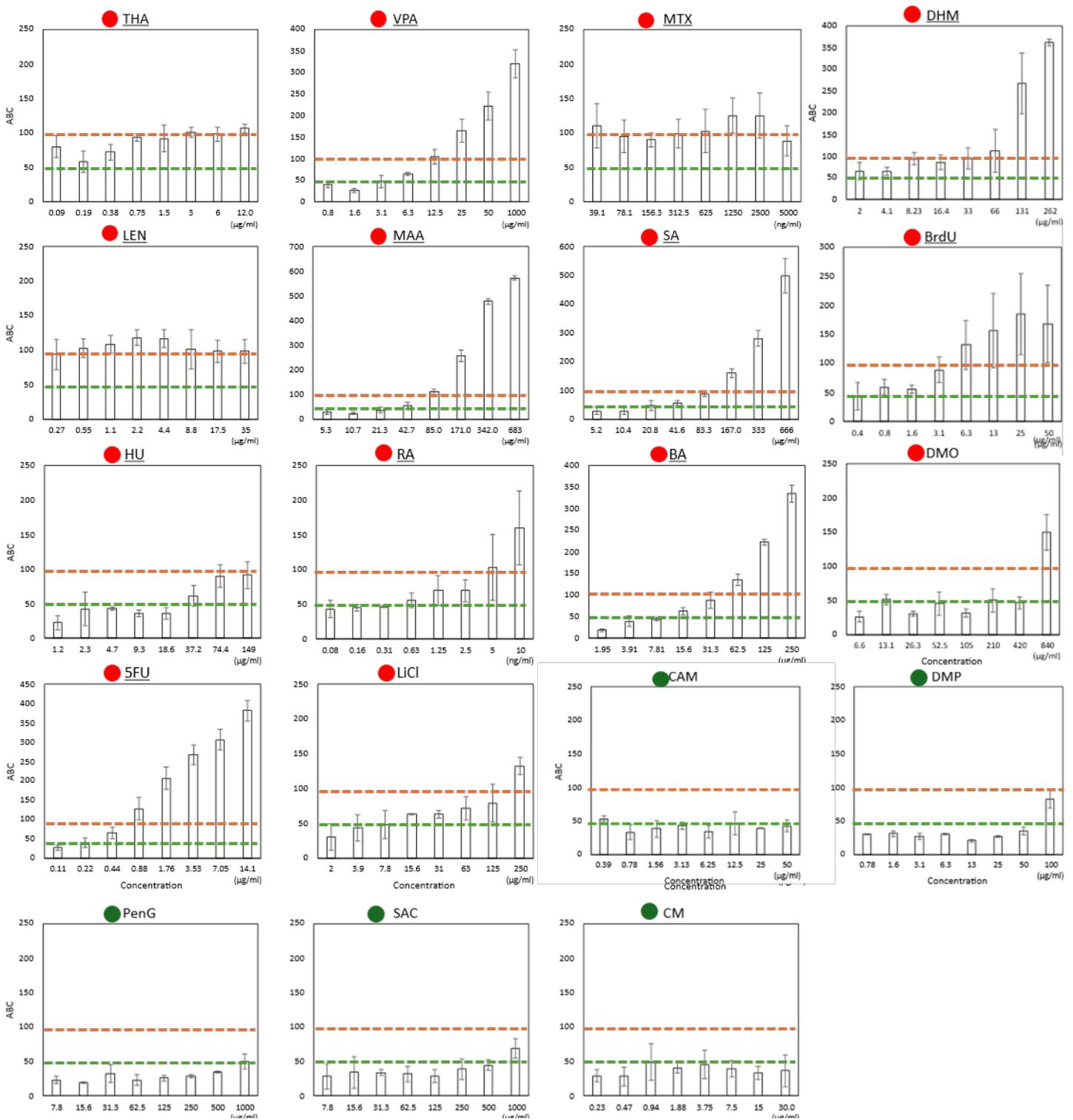


図 10: 各濃度における被験物質のかく乱作用(ABC).

横軸は試験濃度を、ABC 値を示す。オレンジ色の波線、緑色の波線は、ABC の 100、及び 50 を表している。赤色丸、緑色丸は、それぞれ発生毒性陽性対照物質、陰性対照物質を意味する。

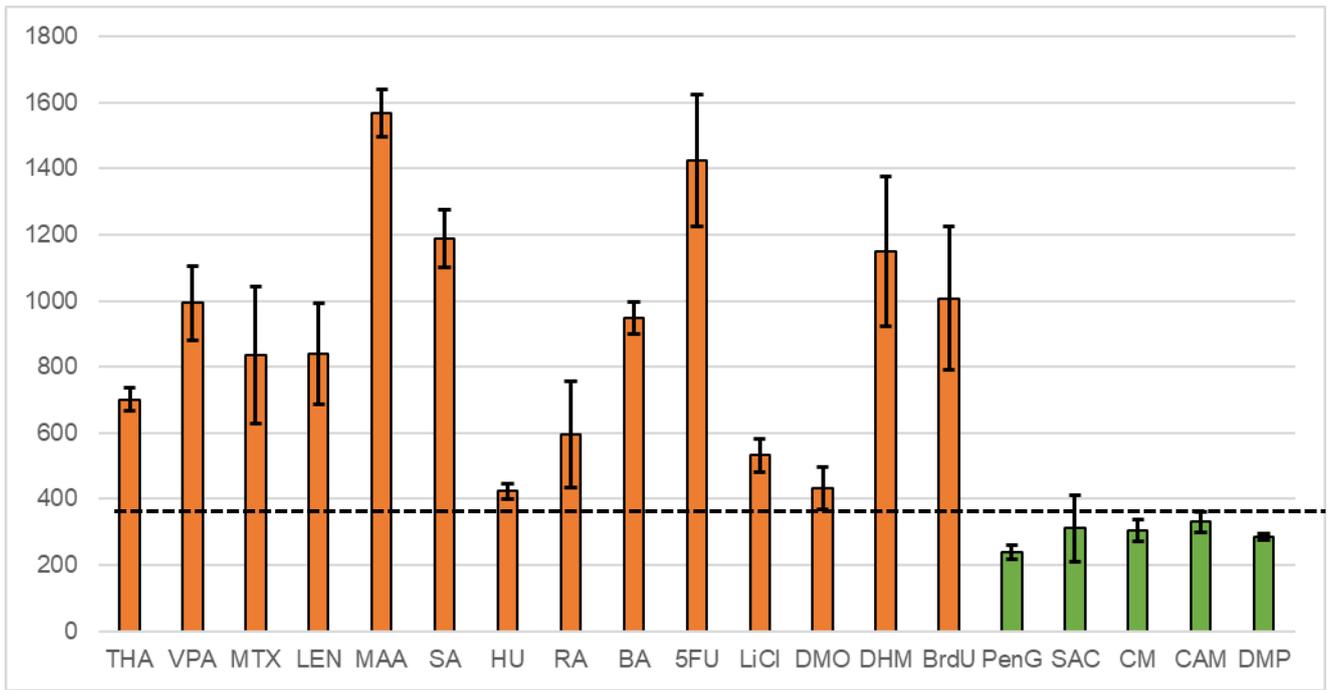


図 11: ABC の和(SUM of ABC)による発生毒性物質の分類

縦軸は SUM of ABC を示す。オレンジ色は発生毒性陽性対照物質を、緑色は発生毒性陰性対照物質を、黒色の波線は閾値を表す。