厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
（総括）研究報告書

食品中に含まれる化学物質の安全性評価に資するハイスループット試験法の開発

研究代表者　芳賀優弥

研究要旨
本研究では、食品中に含まれる化学物質の安全性評価に資するハイスループット試験法の構築を目的として、画像解析技術およびゲノム編集技術を活用した新規評価系の開発を進めた。近年、食品中化学物質の安全性評価においては、遺伝毒性や免疫毒性を対象としたin vitro試験法が広く用いられている一方、操作の煩雑さや解析効率の低さが課題となっている。そこで本研究では、ハイコンテントイメージングと画像解析を基盤とした簡便かつ高精度な評価系の確立を目指した。DNA損傷誘導剤Doxorubicinを用いた検討により、DNA損傷マーカーγH2AXの発現増加や核肥大化を指標とした画像解析系を構築した。また、CellProfilerを用いた小核形成の自動定量法を開発し、DNA損傷に伴う小核出現率の増加を検出可能であることを示した。さらに、大規模画像解析データを効率的に処理するため、Rを用いた解析プラットフォームの開発にも着手した。加えて、本評価系を用いてナノプラスチックのDNA損傷影響評価を実施するとともに、CRISPR-Cas9システムを用いたレポーター細胞構築を進めている。以下に詳細を紹介する。

A．研究目的

食の安全を担保する上で、新規素材や残留農薬等の安全性評価基準の策定は必須の項目である。その点、食品中に含まれる化学物質の安全性評価には、これまでに種々確立されたin vitro試験法が用いられている。例えば、遺伝毒性については、染色体異常を評価可能な小核試験、免疫毒性については炎症性サイトカインを対象とした試験法が開発されている。一方で、これらの各手法は、in vitro試験系であることから比較的簡便であるものの、手法によっては操作が煩雑、もしくは熟練した技術が必要なものも多く含まれている。一方、ハイスループット機器の開発進展（ハイコンテントイメージング、全自動フローサイトメーターなど）や、ゲノム編集技術の台頭による細胞伝達シグナルを可視化できるレポーター細胞の作出などが可能となっており、短時間かつ簡便に大量の条件（多検体、多濃度点）での解析が実現しつつある。安全性評価においても、簡便かつ、より正確で多量の被験物質を扱う試験系の確立が望まれているものの、これら技術の応用は進んでいない。その点、研究代表者はこれまでに環境化学物質や食品含有化学物質を対象とし、遺伝毒性や発がんを始めとする毒性影響を精査するのみならず、その分子機序解明に立脚した影響解明を進めてきた。さらに、画像解析技術を基盤としたハイスループットな細胞形態解析や、ゲノム編集技術を用いたレポーター細胞の作出にも取り組んできた。そこで、本研究では、食品中に含まれる化学物質の安全性評価に資するハイスループットな試験法の構築を目指す。中でも、遺伝毒性と免疫毒性への影響評価に焦点を当て、多量の画像データから小核を検出可能なプログラムの構築（R7～R8年度）、DNA損傷をハイスループットに検出可能なレポーター細胞の構築（R7～R8年度）、炎症性シグナルの変動を定量可能なレポーター細胞の構築（R8～R9年度）を目的とする。本研究が実現されれば、これまで検定可能な濃度点が限られていたアッセイの多濃度点での検討や、従来よりも遥かに多い被験物質での検討等が可能となり、食品中に含まれる化学物質の迅速かつ簡便、かつ高精度な安全性評価に繋がることが期待される。

B．研究方法

B.1. 細胞培養

ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株であるA549は、RIKEN Cell Bank (Ibaraki, Japan)より、チャイニーズハムスターの正常肺より樹立された細胞株であるCHL/IU(IVGT) (以下CHL)は、JCRB細胞バンク（Japanese Collection of Research Biosources Cell Bank, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Osaka, Japan) より購入した。細胞の維持培養には、56℃、30分間の非働化処理を行った10%ウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum; FCS; Biosera; NUAILLE, France) 、1% ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB懸濁液 (Wako Pure Chemical Industries; Osaka, Japan) を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium (high-glucose) (for A549, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) もしくはEagle's Minimum Essential Medium (for CHL, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)を用い、37℃、飽和蒸気圧、5% CO_2条件下で培養した。

B.2. 被験物質

DoxorubicinはMedchemExpress（Monmou

th, NJ, USA）より購入した。また、既報（Tanaka et al., Small, 2021）を参考に、ポリ塩化ビニル由来ナノプラスチック（PVC-NPs）を作製した。PVCマイクロプラスチック12 mgをシクロヘキサノン3 mL に溶解し、DMSOと混合溶媒を加えた反応系を 40–42℃で攪拌した。加熱開始から2.5時間後、ポリマー溶液を一定速度で滴下し、反応後に冷却した。得られた懸濁液をステンレスメッシュおよび複数段階のフィルターで濾過し、超音波処理と溶媒洗浄を併用して粒子を精製した。最終的に0.2 μm フィルター上に回収した粒子を乾燥後、t-ブタノール中で超音波処理により回収し、凍結乾燥によってPVC-NPsを得た。PVC-NPsの劣化処理には、波長172 nmの真空紫外光を照射可能なフラットエキシマランプを用いた。サンプルをシャーレ上に展開し、光源から約10 mmの距離で90分間照射した後、回収して解析に供した。

B.3. 画像解析

取得した蛍光画像については、オープンソースソフトウェアCellProfiler（Ver 5, Whitehead Institute for Biomedical Research, MA, USA）を用いて画像解析を行った。
γH2AXの解析については、まず、DAPI 染色画像を用いて核（Nuc）をPrimary Objectとして認識させた。核の同定にあたっては、直径 40〜300 ピクセルの範囲を対象とし、画像端に接するオブジェクトは除外した。隣接する核については形状情報に基づく分離処理を行い、グローバル閾値法（Minimum Cross-Entropy 法）により核領域を抽出した。同定した核領域に対して、核形態に関する指標として核面積などのサイズ・形状パラメータを算出した。また、DNA損傷マーカーであるγH2AX染色画像を用い、各核内におけるγH2AXの蛍光強度を1細胞単位で定量した。解析により得られた各細胞の形態情報および蛍光強度データは、画像ごとのメタデータ（Plate、Well、Site等）とともに CSV 形式で出力し、以降の統計解析に供した。
小核の解析については、核染色（DAPI）画像を用い、まず主核（Nuc）をPrimary Objectとして認識した。核の同定にあたっては、直径 80〜500 ピクセルの範囲を対象とし、画像端に接するオブジェクトは除外した。隣接する核については形状情報に基づく分離処理を行い、Minimum Cross-Entropy法により核領域を抽出した。次に、同定した核領域を基に、核を外側へ 50 ピクセル拡張した領域を作成し、拡張核領域から主核領域を差し引くことで 細胞質領域（Cytoplasm）を定義した。小核の検出については、同一の核染色画像を用い、直径 10〜50 ピクセルの小核をPrimary Object（MicroNuc）として抽出した。小核の識別には強度情報に基づく分離手法を用い、Minimum Cross-Entropy法により領域を決定した。画像端に接するオブジェクトは除外した。検出された小核については、細胞質領域をマスクとして適用し、細胞質内に存在する小核のみを解析対象とした。細胞質と小核の対応関係を定義することで、各細胞における小核の出現を細胞単位で評価可能とした。最終的に、主核および小核に関するサイズ・形状情報を定量化し、画像ごとのメタデータ（Plate、Well、Site 等）とともに CSV 形式で出力し、以降の統計解析に供した。

B.4. 蛍光染色

被験物質を曝露してから24もしくは72時間後に細胞を4% PFAを37 ℃で15分間処置することで細胞を固定し、0.1% Triton X-100 in PBSを室温で10分間作用させることで透過処理を行った。その後、DAPI（Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA）を作用させた。免疫蛍光染色には、透過処理の後、PBSで3回washした後、1% BSA/PBS（BSA; Sigma Aldrich）を200 μL/wellで添加し、室温で30分ブロッキングした。その後、1% BSA/PBSを用いて希釈した一次抗体（Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) #9718, CST, Danvers, MA, USA）を添加し4℃で一晩静置した。PBSで3回washした後、1% BSA/PBSを用いて希釈した二次抗体(Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488 #A-11008; Invitrogen, MA, USA)を添加し、室温で45分反応させた。撮影は、ハイスループット細胞機能探索システムCellVoyager CV8000（CV8000; Yokogawa, Tokyo, Japan）を用いて実施した。

B.5. 遺伝毒性評価用レポーター細胞の構築

CRISPR-Cas9システムを用いたノックイン用ドナーベクターを作製するため、ホモロジーアーム、蛍光遺伝子配列、および選択マーカー配列をそれぞれPCRにより増幅した。まず、両側のホモロジーアーム（Left HA, Right HA）は、Caco2 細胞由来のゲノムDNAを鋳型としてPCR増幅した。Left HA はLeft HA-fおよび LeftHA-rプライマーを用いて増幅した。同様に、Right HAはRight HA-fおよびRight HA-rプライマーを用いて増幅した。次に、リンカー配列および蛍光タンパク質（Linker-FP）は、市販オリゴ由来の5GA_sfGFP_P2A_Bsd配列を鋳型としてPCR増幅した。Linker FP-fおよびLinker FP-rプライマーを用いて増幅し、翻訳終止コドンを含む配列設計とした。さらに、プロモーター、薬剤耐性遺伝子、およびpolyA配列は、市販プラスミド（Cat. HG10346-CF, Sino Biological, Beijing, China）を鋳型としてPCRにより増幅した。RG-fおよびRG-rプライマー（RG: Resistance gene）を用いて増幅した。加えて、同プラスミド(HG10346-CF)を鋳型として、E.coli増幅用カセットをEcoli-fおよびEcoli-rプライマーによりPCR増幅した。各PCR産物については、アガロースゲル電気泳動により増幅を確認した後、必要に応じてゲル抽出またはPCR産物精製を行った。

CRISPR-Cas9ノックイン用ドナーベクター作製に用いたPCRプライマー配列を以下に

示す。プライマー配列中の大文字は、隣接するフラグメントとのオーバーラップ配列を示す。

Name	Primer sequence (5′–3′)
Left HA-f	tccaatatgaccgccatgttGCA ATGTTATAACAT
Left HA-r	ccagcgcctgcaccagctccGGG CTTCCTCTTGGA
LinkerFP-f	tcttctccaagaggaagcccGG AGCTGGTGCAGGC
LinkerFP-r	ccacaccctaactgacacacTTA TTTGTAGAGCTC
RG-f	tggatgagctctacaaataaGT GTGTCAGTTAGGG
RG-r	ggcttcctgtgggcggattaTAA GATACATTGATG
Right HA-f	aaactcatcaatgtatcttaTAA TCCGCCCACAGG
Right HA-r	ggtcgacggtatacagacatCC TCACCCCCACAGC
Ecoli-f	ctctagctgtgggggtgaggAT GTCTGTATACCGT
Ecoli-r	gtcttatgttataacattgcAAC ATGGCGGTCATA

（倫理面への配慮）
本研究計画では効果的な安全性評価研究の実施に際して、遺伝子組換え実験を行う可能性があるが、「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」に基づいて適切に実施すると共に、所属機関の組換えDNA実験委員会の承認を受ける（関連研究は既に機関承認実験として承認されている）。

C．研究結果

C.1. 画像解析を用いたハイスループット遺伝毒性評価法の確立

画像解析技術を用いたハイスループットな遺伝毒性評価法の確立を目的として、まず遺伝毒性の中でも DNA損傷 に着目し、DNA損傷性が既に明らかとなっている化学物質をモデルとして評価法の構築を試みた。具体的には、複数の細胞株において Doxorubicin（Dox ; DNA損傷誘導剤）を処置し、DNA損傷マーカーの発現評価および画像解析手法の確立を行った。その結果、DNA損傷時に核内で発現が増加することが知られている γH2AX について、Dox 処置により顕著な発現増加が認められた。さらに、DNA損傷に伴って生じる核の肥大化についても、核染色画像から明瞭に確認された。これらの結果から、画像解析手法の確立に適した画像セットが得られたと判断した（図1A）。
次に、無料ソフトウェア CellProfiler を用いて、取得した画像から蛍光強度や核形態情報などの定量的指標を抽出する手法の構築を試みた。CellProfiler は MIT にて開発されたオープンソースソフトウェアであり、無料で入手可能であるとともに、Windows および Mac の両 OS に対応している。まず、γH2AXの蛍光強度について、核内の蛍光強度を 1 細胞ごとに算出する解析プロトコルを作成した（詳細は研究方法に記載）。その結果、Dox 曝露群において、対照群と比較して有意な増加が認められた（図1B, C）。さらに、細胞核の形態が DNA 損傷と関連することが示唆されていることから、より多角的な解析を可能とするため、核の肥大化に着目した解析を実施した。その結果、Dox 曝露群において核面積が増加することが示された（図1D）。
次に、DNA 損傷によって誘導される 小核（細胞内に存在し、主核近傍に形成される小さな核）について、定量化手法の開発を試みた。Doxorubicin曝露後の核染色画像のみを用いて主核を認識した後、その近傍領域を追加で定義し、その領域内に存在する DNA 由来の蛍光シグナルを小核として評価した。その結果、Dox 曝露群において小核の出現割合が増加することが明らかとなった（図2A, B）。
これらの画像解析データは、「各細胞の特徴量 × 細胞数」という大規模データとして出力されるため、Excel などの一般的な数理処理ソフトウェアでは動作が重く、解析が困難である。一方、R や Python といった統計解析ソフトウェアは、大量データの解析を前提としたツールであるものの、プログラミングに精通していない研究者にとっては利用のハードルが高いという課題がある。そこで、本研究では R を用いたユーザーフレンドリーな解析プラットフォームの構築にも着手した。本プラットフォームでは、複雑なコードを記述することなく、CellProfiler から出力されたファイルをそのまま解析することが可能である。具体的には、Well 情報に基づく群分けの指定、各特徴量のグラフ表示、視野ごとの特徴量の可視化、ならびにそれらに対応する実データの Excel ファイル出力などが可能となっている。なお、本プラットフォームは今後さらに機能拡張が可能であり、より高度な解析機能の実装を予定している。

C.2. ナノプラスチックのDNA損傷評価

C.1.にて確立した手法を用いて、現在環境中への流入やヒト体内での検出が示唆されているナノプラスチックのDNA損傷への影響を評価した。なお、本検討では、5 mm以下のマイクロプラスチックではなく、細胞に取り込まれる可能性のある1 μm以下のナノプラスチックを検討に用いた。ポリマー種としては、ポリ塩化ビニルを選択し、表面劣化の有無による違いを評価した。その結果、A549, CHLいずれにおいても今回の条件（0.01 mg/mL, 0.1 mg/mL）においてはγH2AXの発現に顕著な変動は認められなかった。

C.3. 遺伝毒性評価用レポーター細胞の構築

これまでの遺伝毒性評価では、特定の時点で細胞を固定し、核染色あるいは抗体を用いた免疫蛍光染色を行った後に画像撮影を実施してきた。しかしながら、将来的により詳細

かつ簡便に遺伝毒性を鋭敏に捉えるためには、DNA 損傷の程度を経時的に評価できる系や、染色操作を必要としない評価系の構築が求められる。そこで本研究では、内在性遺伝子の発現を蛍光シグナルとして可視化・追跡可能なレポーター細胞の構築を試みている。具体的には、CRISPR-Cas9 システムを用い、蛍光遺伝子を内在性遺伝子にノックインする手法を採用した。本手法では、Cas9 発現ベクター、内在性遺伝子のストップコドン近傍を標的とする gRNA、ならびに付加する蛍光遺伝子および選択用耐性遺伝子をコードしたドナーベクターが必要となる。現在、これらの構成要素を細胞へ導入するための各種ベクターの構築を進めている。

D．考察

本年度確立した画像解析手法については、いずれも無料で研究者自身が容易に解析できるものであり、汎用性の高い手法であると考えられる。また、ナノプラスチックの遺伝毒性についても検討したが、顕著なDNA損傷は認められなかった。今後は添加剤なども考慮に入れた検討を進めることで、ナノプラスチックが示す遺伝毒性への影響を精査することが求められる。

E．結論

本年度は主に遺伝毒性に着目し、その迅速評価系の確立とレポーター細胞の作製に着手した。今後は、レポーター細胞の構築を進めると共に、免疫毒性のレポーター細胞の作出に取り組む。

F．健康危険情報

特になし。

G．研究発表

1. 論文発表

- Kitamoto N., Haga Y., Tsujii Y., Kubo M., Higashisaka K., Tsutsumi Y. ：Effect of benzo[a]pyrene on cellular senescence in MCF7 breast cancer cells., Biol. Pharm. Bull. 48(10):1540-1546., 2025.

2. 学会発表

- 北本夏子, 芳賀優弥, 久保美南海, 東阪和馬, 堤　康央 : ベンゾ[a]ピレンは乳がん細胞に細胞老化を誘導し遊走性を促進する., 第52回日本毒性学会学術年会., 沖縄（沖縄）, 2025年7月.
- Phyo BB.A., Haga Y., Tsujino H., Manabe S., Idehara W., Hokaku M., Motoyama Y., Mori A., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Establishment of environmental relevant polyvinyl chloride microplastics and nanoplastics considering their physiochemical properties for the safety assessment., 第52回日本毒性学会学術年会., 沖縄（沖縄）, 2025年7月.
- Phyo BB.A., Haga Y., Tsujino H., Manabe S., Idehara W., Hokaku M., Motoyama Y., Mori A., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Establishment of environmental relevant polyvinyl chloride micro- and nanoplastics considering their physicochemical properties for the safety assessment., The XVIIth International Congress of Toxicology, Beijing (China), 15-18 October, 2025.

H．知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特になし。

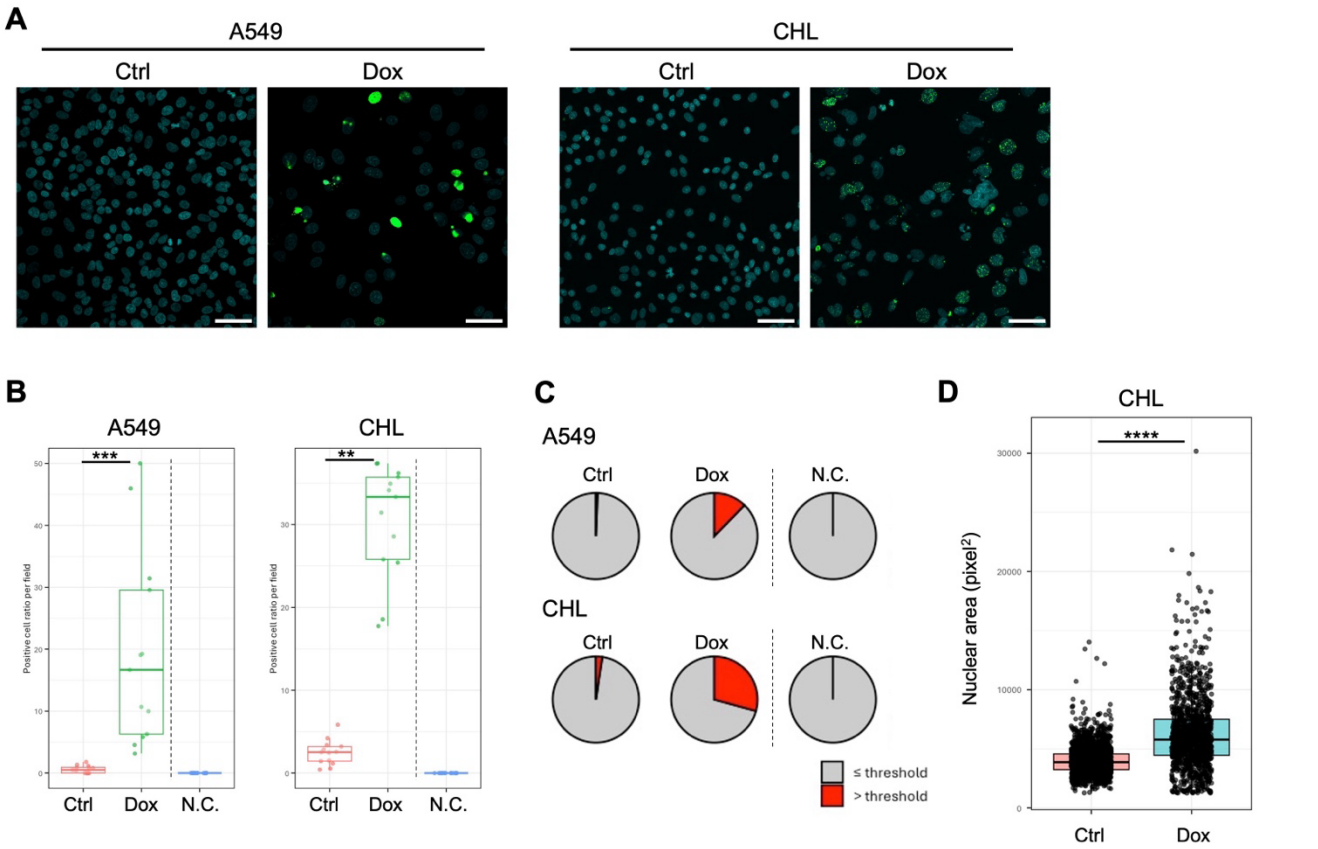


図1. DNA損傷誘導時におけるγH2AX変動と核の肥大化
A549またはCHL細胞にDoxorubicin（1 μM）を曝露し、以下の解析に用いた。
(A) A549（24 h）およびCHL細胞（72 h）における免疫染色画像。核染色（Cyan）およびγH2AX（Green）を示す。Scale bar: 50 μm.
(B) γH2AXの蛍光強度が閾値（mean intensity = 0.1）を超えた細胞の割合を、各視野ごとに示した。N.C.: negative control. ***p < 0.001, **p < 0.01 by Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test.
(C) γH2AXの蛍光強度が閾値（mean intensity = 0.1）を超えた細胞の割合を、各群ごとに示した。N.C.: negative control.
(D) CHL細胞におけるCtrlおよびDox曝露時の核サイズを示した。****p < 0.0001 by Mann–Whitney U test.

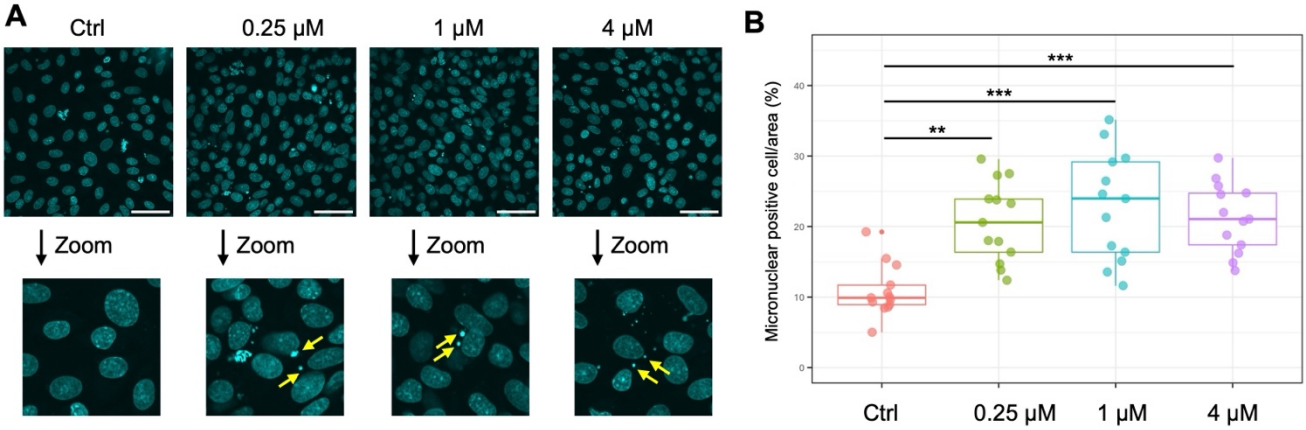


図2. Doxorubicin曝露による小核への影響解析・画像データ解析プラットフォーム・DNA損傷レポーター細胞の確立に向けたベクターの構築
(A) CHL細胞に各濃度のDoxorubicinを24時間曝露し、DAPIにより核を染色した。Scale bar: 50 μm。黄色矢印は小核を示す。
(B) 小核が認められた核の割合を、各視野ごとに示した。***p < 0.001, **p < 0.01 by Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test.