別添３

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

食品由来化学物質のリスク評価のための多層的 in vitro 評価系の開発

研究代表者　藤岡　正喜　大阪公立大学大学院医学研究科分子病理学　講師

研究要旨

食品安全行政において、本邦では食品の危害因子を評価し、防除する為に必要な基準策定を行っている。カビ毒のアフラトキシンや農薬マラチオンなど、食品関連物質の毒性評価が重要である一方で、評価のための標準法であるげっ歯類を用いた 1 年間慢性毒性試験および 2 年間発がん性試験は、時間的・経済的・人的コストが膨大であり、全ての物質への対応は困難である。本研究では、先行研究(厚生労働科研：鰐渕班 H29～R2 および R2～4）で得られた包括的なラット毒性データベース（肝臓組織及び遺伝子データおよび毒性・発がん性評価数理モデル）および Open TG-GATEs を活用し、ヒト *in vitro* 評価系の開発と検証を行うことを目的とした。令和 7 年度は、ヒト不死化肝細胞株（HepaRG および HepaMN）を用いて基盤となる *in vitro* 評価系を検証した。被験物質を添加する細胞培養条件として、96 ウェルプレートを用いて、播種細胞数を 5,000 細胞、被験物質の溶媒を DMSO とし、その最終濃度は 1%を設定した。本年度は、先行研究で評価した化学物質のうち、食品関連化学物質として報告されている Methimazole、Coumarin、Ethinylestradiol および Retinol の 4 物質を対象に、細胞生存アッセイを実施し、各物質の LC50 値を取得した。その結果、2 つのヒト不死化肝細胞株への毒性影響は近似しており、ヒト肝細胞に対する影響は細胞株間での差は小さく、ヒトへの外挿する際に人種差などは少ない可能性を示した。さらに、既報の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルの手法に従い、LC50 の 3 分の 1 濃度で 24 時間添加後の mRNA を回収し、遺伝毒性肝発がん物質検出遺伝子セットに基づく解析を行い、いずれも遺伝毒性肝発がん物質の判定は陰性となった。以上の結果より、本試験法は，ヒトに対する安定的な毒性を評価出来る可能性を示し、検討した 4 物質は遺伝毒性発がん物質でない可能性を示した。

A．研究目的

食品安全行政において、本邦では食品の危害因子を評価し、防除する為に必要な基準策定を行っている。カビ毒のアフラトキシンや農薬マラチオンなど、食品関連物質の毒性評価が重要である一方で、評価のための標準法であるげっ歯類を用いた1年間慢性毒性試験および2年間発がん性試験は、時間的・経済的・人的コストが膨大であり、全ての物質への対応は困難である。

上記課題を解決するため、様々な*in vitro*評価系の開発が進められているが、*in vivo*試験で得られた知見の*in vitro*評価系での再現性と、その限界について体系的に検証した研究は不十分である。さらに、化学物質による毒性・発がん性影響には、げっ歯類特異的な反応（PPARα経路による発がん）も知られており、ヒトへの外挿性についても課題が残されている。

本研究では、先行研究(厚生労働科研：鰐渕班 H29～R2およびR2～4）で得られた包括的なラット毒性データベース(肝臓組織及び遺伝子データおよび毒性・発がん性評価数理モデル）およびOpen TG-GATEsを活用し、ヒト*in vitro*評価系の開発と検証を行う。また、*in vivo*試験データとの相関解析により、*in vivo*-*in vitro*双方の結果から裏打ちされた予測性能80%以上を目標とした評価系の確立を目指す。

B．研究方法

［材料と方法］

本研究で使用した被験物質について、下記に示す。

・Methimazole (MTZ), CAS: 60-56-0
・Coumarin (CMA), CAS: 91-64-5
・Ethinylestradiol (EE), CAS: 57-63-6
・Retinol (VA) CAS: 68-26-8

なお、本研究で使用した培養細胞についてヒト不死肝細胞株であるHepaRG（欧米人由来)およびHepaMN（日本人由来)を用いて、以降に記す試験に供した。

［培養条件の検討］

１．細胞播種数の検討

細胞生存アッセイ（WST-8 assay)の実施に適した培養条件を確立するために、細胞播種数について検討した。HepaRG 細胞を 96 well プレートに 1 well あたり 3000、5000、8000 および 10000 細胞にてそれぞれ播種した。HepaMN 細胞については、細胞数を確認後 96 well プレートへ 1 well あたり 3000、5000、8000 および 10000 細胞にてそれぞれ播種した。各細胞の 96 well プレートへの播種翌日に光顕下にて観察を行い、コンフルエンシーを確認した。

２．被験物質の溶媒および細胞への溶媒添加濃度の検討

被験物質を培地中に添加するための溶媒の検討および細胞への添加濃度について検討を行った。溶媒について、PBS，エタノールおよびジメチルスルホキシド（DMSO)について、各被験物質の 100 mM ストックが調整可能な溶媒について検討

を行った。さらに、96 well プレート上に細胞を播種し、24 時間後に DMSO を 0, 1 および 2%の濃度で添加し、添加 24 時間後に WST-8 assay を実施して細胞の生存率について検討を行った。

［被験物質添加による LC50 値の取得］

上記培養条件の検討にて取得した本研究における培養条件（細胞播種数: 5000 細胞/well、溶媒:DMSO、DMSO に最終添加濃度: 1 %)の下で、各被験物質の最終濃度を 0, 0.1, 1, 10 および 100 μM となるよう調整し細胞へ添加した。添加 24 時間後に WST-8 assay を実施し、吸光度値を取得した。得られた吸光度値より各濃度の生存率を算出した。LC50 値の算出方法について、下記に記す。投与濃度を Log 変換し各濃度の生存率とともに GraphPad Prism software 11 にて線形回帰（カーブフィット法）で得られた値を log(agonist) vs normalized response - Variable slope 解析にて LC50 値を算出した。

［先行研究で構築した遺伝子マーカーセットの qPCR 解析］

先行研究で構築した、遺伝毒性肝発がん物質検出のための遺伝子マーカーセット 10 遺伝子（AEN, ATP6V1F, CDKN1A, FAM49A, GURX3, MOK, MYBL1, NUDT5, PHLDA3 および UGCA)について、発現解析を実施した。5 x 10^5 cells にて 6 well プレートに細胞を播種し、90%コンフルエントに達した細胞に被験物質を添加し、添加 24 時間後に mRNA を回収して上記遺伝子マーカーセットの qPCR を実施した。なお被験物質の添加濃度については、先行研究と同様に LC50 値の 3 分の 1 の濃度で添加した。また、qPCR 解析の際の内部標準遺伝子として 18S rRNA を用いた。

［統計学的解析］

qPCR 解析における有意差検定について、F 検定による等分散検定を行った。等分散の場合は Student’s t-test 検定を行い、不等分散の場合は Welch t-test 法による両側検定を行った。

（倫理面への配慮）

該当なし

C．研究結果

［培養条件の検討］

WST-8 assay 実施のための適切な細胞数について検討した結果、播種から 24 時間後の細胞のコンフルエンシーが、HepaRG 細胞では、3000 細胞で約 70～80%、5000 細胞で約 85～95%、8000 および 10000 細胞でコンフルエンシーが 100%を超え、死細胞がみられた。HepaMN 細胞では、3000 細胞で約 60～70%、5000 細胞で約 85～95%、8000 および 10000 細胞でコンフルエンシーが 100%を超え、死細胞がみられた。したがって、本研究における適切な細胞数は 5000 細胞と決定した。

さらに被験物質を溶解するための適切な溶媒について検討した結果、MTZ は PBS, エタノールおよび DMSO いずれにおいても容易に溶解した。CMA は PBS およびエタノールにて溶解した一方で、溶液が白濁し、以降の WST-8 assay に影響する可能性が示唆された。DMSO での溶解では、溶液の白濁はみられなかった。EE および VA では PBS およびエタノールに対して不溶あるいは難溶で、DMSO には容易に溶解した。したがって、本研究における被験物質の溶媒として DMSO を選択した。WST-8 assay に適した DMSO の最終濃度について検討した結果、HepaRG および HepaMN いずれにおいても、DMSo 1%添加にて生存率の低下や細胞形態の変化がみられなかった事から、1%が適切であることが明らかとなった。

以上の結果から、本研究における細胞の培養条件は、96 well プレートに対して 1 well あたり 5000 細胞、被験物質の溶媒として DMSO、DMSO の細胞への最終添加濃度は 1%と決定した。

［被験物質添加による LC50 値の取得］

各被験物質添加による LC50 値の算出結果を図 1 および、表 1 で示す。HepaRG 細胞において、各物質の LC50 値は、それぞれ MTZ 1.873 uM、CMA 4.638 uM、VA 9.917 uM、EE 1.354 uM であった。HepaMN 細胞において、各物質の LC50 値は、それぞれ MTZ 2.001 uM、CMA 4.182 uM、VA 9.632 uM、EE 1.807 uM であった。

［先行研究で構築した遺伝子マーカーセットの qPCR 解析］

先行研究で構築された遺伝毒性肝発がん物質検出のための遺伝子マーカーセット 10 遺伝子における qPCR 解析の結果を図 2 および 3 に示す。qPCR 解析の結果、HepaRG 細胞において、対照群（DMSO 添加群)と比較して、CDKN1A 遺伝子の有意な発現増加が MTZ 添加群でみられた。また ATP6V1F 遺伝子の有意な発現増加が EE 添加群でみられた。その他の被験物質については、いずれの遺伝子においても有意な発現変動はみられなかった。HepaMN 細胞において、対照群（DMSO 添加群)と比較して、CDKN1A 遺伝子の有意な発現増加と GURX3 遺伝子の発現増加傾向が MTZ 添加群でみられた。また ATP6V1F 遺伝子の有意な発現増加が EE 添加群でみられた。その他の被験物質については、いずれの遺伝子においても有意な発現変動はみられなかった。一方で、その発現変化について、遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法で用いたサポートベクターマシンでの解析を行い、いずれも陰性と判定された。

D．考察

今年度は2種類のヒト不死化肝細胞株（HepaRGおよびHepaMN)を用いて、被験物質のLC50値を評価するために、培養条件の検討および各種被験物質におけるLC50値の算出と遺伝毒性肝発がん物質検出のための遺伝子マーカーセットのqPCR解析を実施した。MTZ, CMA, VA添加で得られたLC50値について、HepaRGおよびHepaMNの両者で比較的近似したLC50値が得られた。また、先行研究で得られた遺伝毒性肝発がん物質検出のための遺伝子マーカーセット10遺伝子のqPCR解析の結果、同一被験物質においてHepaRGおよびHepaMNの両者で比較的近

似した発現パターンが得られた。HepaRG細胞は欧米人助成の肝がん由来細胞であり、またHepaMN細胞は胆道閉鎖症の日本人患者由来肝細胞を不死化した細胞であることから、両者を比較することで、人種が異なることによる化学物質への感受性差が検討できることが期待される。今回検討した4物質では、人種の違いによる感受性差はみられなかった。

先行研究にて構築した遺伝子マーカーセットによる遺伝毒性肝発がん物質判定モデルにおいて、ラットを用いた研究と同様に、2種類のヒト不死化肝細胞株において判定結果は陰性となったことから、ヒト不死化肝細胞株においてもラットと同様の結果が得られる可能性が示唆された。また今回検討した4物質のうち、投与24時間後の組織学的変化として、ラット肝臓における小葉中心性の好酸性変化がCMAでのみ、Open TG-GATEsにて報告されていることから、CMA添加後の細胞の形態変化について、ヒト不死化肝細胞において検討する必要がある。また、ラット肝臓で作成し、制度を検証したモデルであるため、ヒト肝臓への変化を捉えることが可能であるか、今後も検証が必要である。

今後、検討物質を増やすとともに、薬物代謝酵素活性の維持確認（CYP3A4等のP450遺伝子発現）、細胞毒性評価の実施（ATP量、LDH漏出、ミトコンドリア機能）について検討を行い、HepaRGおよびHepaMNの類似点および相違点を明らかにする。また得られた毒性所見が先行研究における病理組織学的変化と相関がみられるかどうか検討を行うことで、*in vivo*および*in vitro*双方から裏打ちされた評価系の確立を目指す。

E. 結論

本研究において基盤となるヒト不死化肝細胞の培養条件を確立する事ができた。また Methimazole, Coumarin, Ethinylestradiol および Retinol の LC50 値を取得し、遺伝毒性肝発がん物質ではないこと可能性を示すことができた。本試験法を用いることで、ヒト肝臓に対する食品由来化学物質による毒性を安定的に評価できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Gi M, Suzuki S, Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander WT, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Noura I, Kakehashi A, Xie XL, Tsuruoka S, Hirose A, Naiki-Ito A, Tsuda H, Wanibuchi H. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways. Nanomaterials (Basel). 2025; 15.
2. Vachiraarunwong A, Fujioka M, Alexander DB, Suzuki S, Guo R, Qiu G, Kawamura Y, Shibano K, Noura I, Praseatsook K, Akane H, Takasu S, Tsuda H, Ogawa K, Wanibuchi H, Gi M. Developing a novel in vitro toxicity assay for predicting inhalation toxicity in rats. Toxicol Lett. 2025; 415: 111803.
3. Guo R, Gi M, Kiyono T, Vachiraarunwong A, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Praseatsook K, Kawamura Y, Kakehashi A, Noura I, Xie X, Wanibuchi H. Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in Toxicity Assessment of Arsenicals. Toxics. 2025; 13.
4. Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. J Toxicol Pathol. 2025; 38: 161-5.
5. Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product ploomTECH+ and 3R4F reference cigarettes. J Toxicol Pathol. 2025; 38: 147-54.
6. Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. J Toxicol Pathol. 2025; 38: 59-67.

2. 学会発表

1. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、梯アンナ、鰐渕英機. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん. 仙台、第114回日本病理学会総会、2025年4月17-19日
2. Vachiraarunwong Arpamas、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、邱桂ギョク、郭潤傑、野浦郁恵、梯アンナ、PRASEATSOOK Kwanchanok、鰐渕英機. ラットの急性吸入毒性を予測する新規 in vitro毒性試験系の開発. 宜野湾市、第52回日本毒性学会学術年会、2025年7月2-4日
3. 梯アンナ、ワチラアルンウオンアルパマス、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機、鈴木周五. MAFLD/MASH 肝発がんマーカーや分子機序への最近の洞察. 九十九里、第38回発癌病理研究会、2025年8月20-22日
4. 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、梯アンナ、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による肝発がん機序の検討. 茅野、2025年度若手支援技術講習会、2025年9月3-5日
5. 梯アンナ、西土井悠作、邱桂鈺、ワチラアルンウオンアルパマス、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機、鈴木周五. ヒト浸潤性膵管癌における新規バイオマーカーとしてPRDX3の検討及び発がん機序解明. 名古屋、がん予防学術大会2025名古屋、2025年9月12-13日
6. Arpamas Vachiraarunwong, Kwanchanok Praseatsook, Rawiwan Wongpoomcha, Shugo Suzuki, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka,

Hideki Wanibuchi, Supachai Yodkeree, Min Gi. Chemopreventive Potential of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae. 名古屋、がん予防学術大会2025名古屋、2025年9月12-13日

7. 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、Vachiraarunwong Arpamas、郭潤傑、河村百合菜、大石裕司、梯アンナ、鰐渕英機. ジメチルアルシン酸(DMA)の経胎盤ばく露によるF1マウスにおける発がん性の検討. 金沢、第84回日本癌学会学術総会、2025年9月25-27日
8. 郭潤傑、Vachiraarunwong Arpamas、鈴木周五、藤岡正喜、Qiu Guiyu、河村百合菜、梯アンナ、鰐渕英機、魏民. DMH投与ラットにおける大腸発がん初期の遺伝子発現変動. 金沢、第84回日本癌学会学術総会、2025年9月25-27日
9. 邱桂ギョク、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Vachiraarunwong Arpamas、郭潤傑、野浦郁恵、河村百合菜、鰐渕英機. カーボンナノチューブ誘発ラット肺発がんにおける物性の違いを踏まえた遺伝子発現変化の比較. 金沢、第84回日本癌学会学術総会、2025年9月25-27日
10. Vachiraarunwong Arpamas、鈴木周五、藤岡正喜、郭潤傑、Qiu Guiyu、野浦郁恵、Kawamura Yurina、梯アンナ、鰐渕英機、魏民. Structure-Dependent Hepatotoxicity and Carcinogenic Potential of PFASs in Immortalized Human Liver Cells. 金沢、第84回日本癌学会学術総会、2025年9月25-27日
11. 梯アンナ、西土井悠作、野浦郁恵、邱桂ギョク、Vachiraarunwong Arpamas、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機、鈴木周五. ヒト浸潤性膵管癌における新規診断及び予後マーカーとしてPeroxiredoxin 3の解析. 金沢、第84回日本癌学会学術総会、2025年9月25-27日
12. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 動物モデルを用いた職業性膀胱がんの研究について. 大阪、日本産業衛生学会第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、2025年10月24-25日
13. Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Kawamura Yurina, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Comparative hepatotoxicity of carboxylate and sulfonate per- and polyfluoroalkyl substances in immortalized human hepatocytes. 大阪、日本産業衛生学会第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、2025 年 10 月 24-25 日
14. 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、Vachiraarunwong Arpamas、野浦郁恵、邱桂鈺、河村百合菜、大石裕司、山口貴嗣、鰐渕 英機. 有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸の経胎盤ばく露による次世代雄性マウスにおける肝発がん機序の検討. 大阪、第30回ヒ素シンポジウム、2025年12月6-7日
15. Arpamas Vachiraarunwong, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Yurina Kawamura, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Min Gi, Hideki Wanibuchi. Comparative evaluation of responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. 大阪、第 30 回ヒ素シンポジウム、2025 年 12 月 6-7 日
16. Guiyu Qiu、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、山口貴嗣、鰐渕英機. Developmental exposure to diphenylarsinic acid selectively alters gene expression in the hippocampus of SD rat offspring. 名古屋、第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2026年1月22-23日
17. 野浦郁恵、鈴木周五、魏民、藤岡正喜、松江泰佑、梯アンナ、鰐渕英機. 加熱タバコ製品Ploom TECH+と3R4F標準タバコに4週間曝露したマウスの肺に対する毒性影響の比較分析. 名古屋、第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2026年1月22-23日
18. 河村百合菜、ワチラアルンウオンアルパマス、藤岡正喜、鈴木周五、邱桂ギョク、郭潤傑、野浦郁恵、梯アンナ、山口貴嗣、鰐渕英機、魏民. ヒト肺腺がん由来細胞株A549を用いたニュートラルレッドアッセイによる化学物質吸入毒性のin vitro代替評価法の開発. 名古屋、第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2026年1月22-23日
19. 梯アンナ、西土井悠作、野浦郁恵、邱桂ギョク、ワチラアルンウオンアルパマス、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機、鈴木周五. 膵管癌における新規診断及び予後マーカーとしてPeroxiredoxin 3の検討. 名古屋、第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2026年1月22-23日
20. 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、ワシラアルンウオンアルパマス、野浦郁恵、邱桂ギョク、河村百合菜、大石裕司、山口貴嗣、梯 アンナ、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸の経胎盤ばく露による雄性仔CD-1マウスにおける肝発がん機序にはDNAメチル化異常が関与する. 名古屋、第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2026年1月22-23日
21. 郭潤傑、Arpamas Vachiraarunwong、鈴木周五、藤岡正喜、Guiyu Qiu、河村百合菜、潘軍成、梯アンナ、鰐渕英機、魏民. Oncomodulin as an early marker in rat models of urinary bladder carcinogenesis. 大津、2025年度文部科学省学術変革領域研究学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会、2026年2月19-20日
22. 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,大阪、日本薬学会第146年会、2026年3月26-29日

H. 知的財産権の出願・登録状況

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。

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。

表1 HepaRGおよびHepaMNにおける各被験物質のLC50値

被験物質	LC50 値 (uM)	
	HepaRG	HepaMN
Methimazole (MTZ)	1.873	2.001
Coumarin (CMA)	4.638	4.182
Retinol (VA)	9.917	9.632
Ethinylestradiol (EE)	1.354	1.807

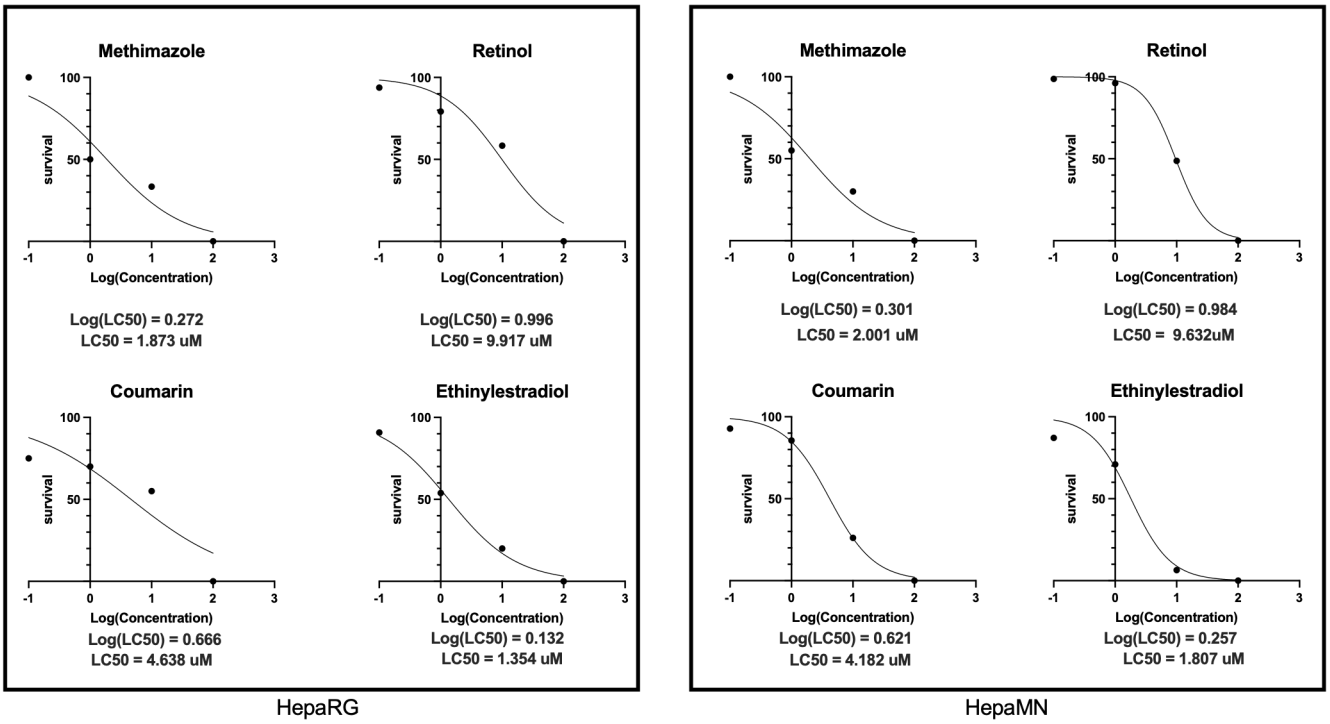
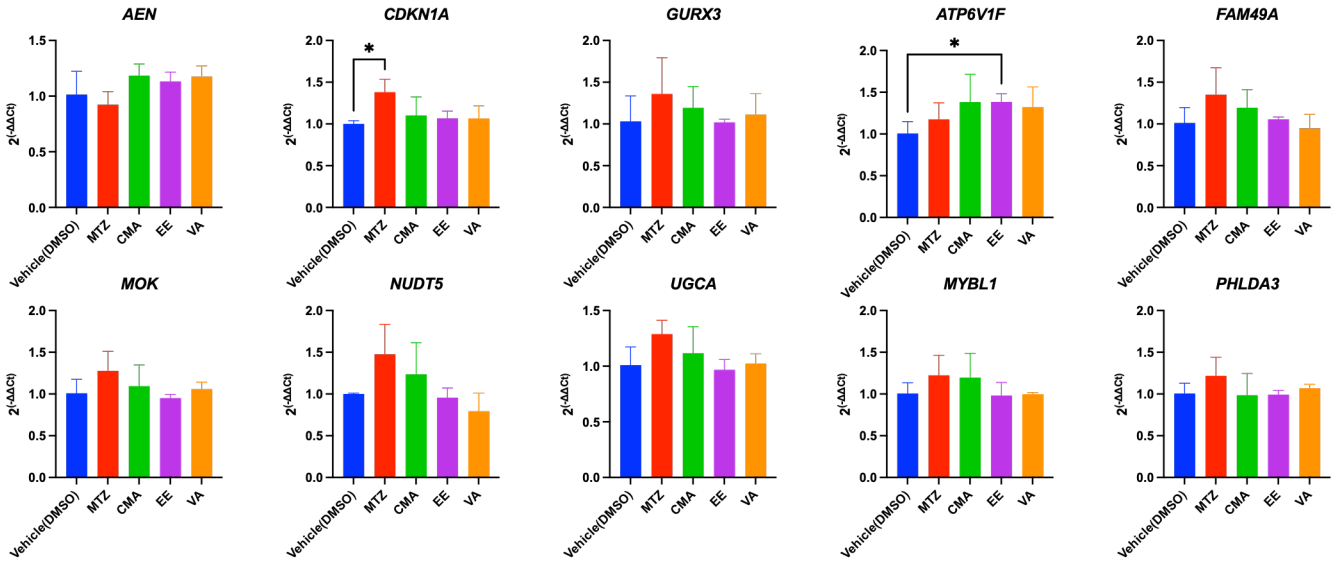
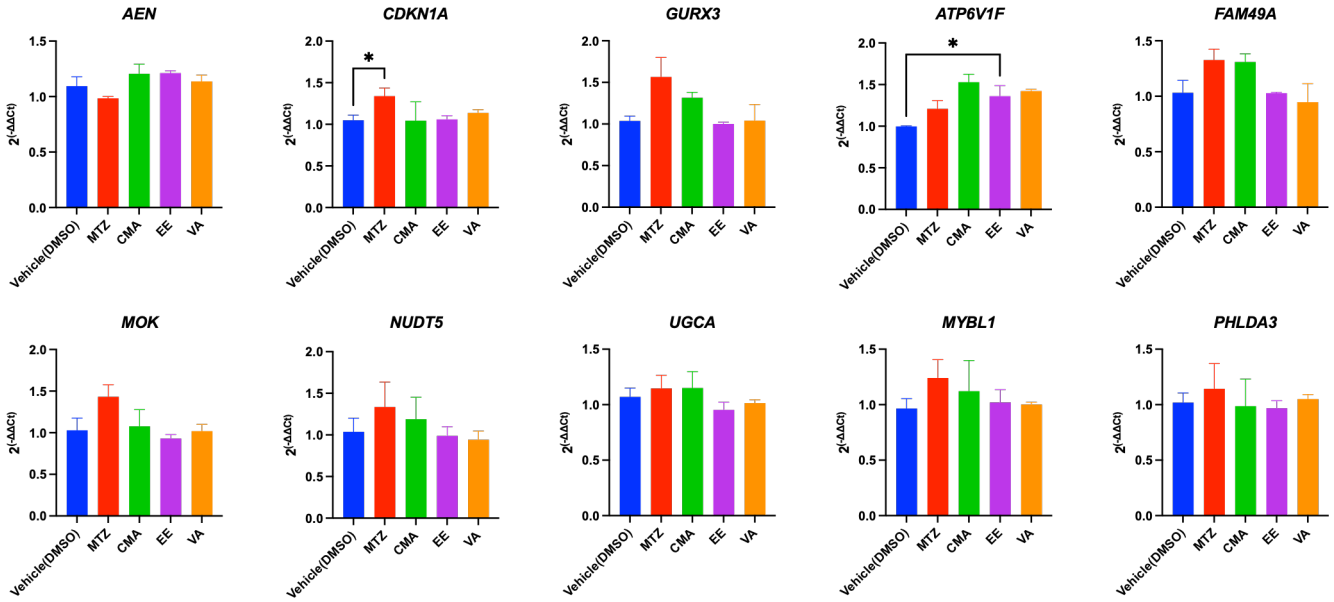


図1 HepaRGおよびHepaMNにおける各被験物質のLC50値の算出結果



*** : p < 0.05 (vs. Vehicle(DMSO) group)**

図2 HepaRG細胞における遺伝子マーカーセットのqPCR解析



*** : p < 0.05 (vs. Vehicle(DMSO) group)**

図3 HepaMN細胞における遺伝子マーカーセットのqPCR解析