

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

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。

同論文では、PhysioMimix Microphysiological System (CN-Bio社) を用いて、PHHまたはHepaRG細胞、肝類洞内皮細胞、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。

C. 研究結果

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1)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2)。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。

全体としては少数であった。EUROTOX 2025では、遺伝毒性+MPSに関する演題はなかった。また、MPS実用化推進協議会第3回学術シンポジウムでも、ポスター演題に遺伝毒性に関するものは確認されなかった。したがって、MPSを用いた遺伝毒性評価は、国内外で注目されつつあるものの、毒性学領域全体の中では未だ発展途上であり、今後の研究開発余地が大きい領域であると考

MPS World Summit 2025

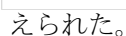


図 2 MPS World Summit 2025 での肝臓に関する演題の詳細

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

- 肝+ヒト化キメラマウス(PXB-cell)
- 肝-NuNa Biosciences社プラットフォーム
- 肝-DILI-PhysioMimix(CN-Bio)
- 肝-MASH+肝毒性(Emulate)
- 肝-MASH+PhysioMimix(CN-Bio)
- 肝+人+384共培養プラットフォーム
- 肝-DILI-3Dバイオプリンティング
- 脂肪肝疾患
- 肝+Digital Twinning-TissUE
- 肝+臓器自動開発
- 肝+臓器高品質Organoids-TissUE
- 肝+臓器高品質Organoids-TissUE
- 肝+スウェーデン代謝リジェネシス
- 肝+ニュージーランドBioGenium Microsystems
- 肝+ニュージーランド3Dバイオプリンティング
- 肝+がんのフェロイド
- 肝+腫瘍免疫オルガノイド+宇宙
- 肝+腫瘍免疫(TissUE)+細胞
- 肝+腫瘍免疫(TissUE)+細胞
- 肝+血管+がん
- 肝+がん+生体+発生-Akura Immune Flow
- 肝+がん+C型肝炎
- 肝+血管性シェフロード
- 肝+皮膚-InSphero
- 肝-MASH+デジタル病理学
- 肝+マリアンナ
- 肝+腎+神経+皮膚+肺-MepsGen
- 肝+腎+がん+3Dプリンティング
- 肝+腫瘍+神経-Hesperos
- 肝+胆汁排泄評価-HepSH
- 肝+腫瘍-MStE
- 肝+腎+筋肉
- 肝+腫瘍+センサー
- 肝+脳+炎症+免疫+ガンツェル-CN-Bio
- 肝+デングウィルス-Ministas
- 肝+ベネズエラウイルス感染ウイルス
- 肝+腎+腫
- 肝+腫瘍+hESC
- 肝+抗体リゲーション
- 肝+免疫PhysioMimix(CN-Bio)
- 肝+免疫PhysioMimix(CN-Bio)
- 肝-PXB-cell-Shizuka medium
- 肝-Fluid3D-X
- 肝+神経+痛み
- 肝+ランタン酸-脂質試
- 肝-DILI-PhysioMimix(CN-Bio)
- 肝-MASH+CellGrid
- 肝+マリアンナ-CR36 (96 plate)
- 肝+心+腎+老年疾患+多臓器合併症
- 肝+免疫
- 肝+がん+間質/リウマチ
- 肝+血液+がん+骨髄+免疫
- 肝+スフェロイド+6PDD+Xen
- 肝+炭素質再生環境-PhysioMimix(CN-Bio)
- 肝+肝+Bisectar Cell
- 肝+肝+高品質Bisectar Cell
- 肝+腫瘍+神経
- 肝+腫瘍+神経
- 肝+腫瘍+神経+皮膚
- 肝+NAFLD-Estateo Chip
- 肝+胎児+生体+発生+オルガノイド
- 肝+胎児+オルガノイド+CPB誘導
- 肝+胎児+がん+オルガノイド
- 肝+腫瘍+腎+オルガノイド

ダーが参加している。第3回学術シンポジウムでは参加登録数381、ポスター演題44、企業展示43、ハンズオン10社とされ、国内におけるMPSへの関心の高まりが示された。

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。

2

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

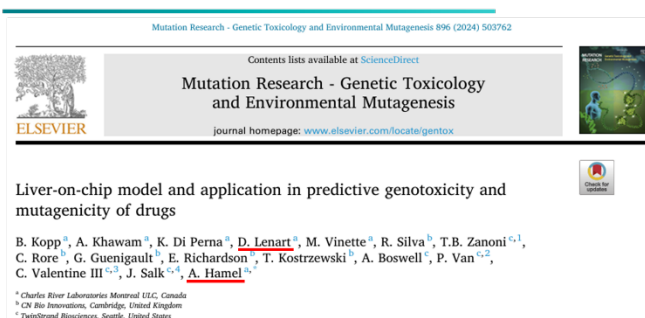


図3 遺伝毒性およびMPS論文の紹介

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

