

令和7年度 厚生労働科学研究費 補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
分担研究課題名: ecNGS法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の
開発

研究分担者：杉山圭一、鈴木 孝昌、諸角涼介

所属 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター ゲノム安全科学部

研究要旨

本研究では、error-corrected next generation sequencing (ecNGS) 法を用いた発がん性予測に資する in vivo 遺伝毒性評価法の開発を目的として、ラット試料における用量反応性評価への適用可能性を検証し、併せてFFPEサンプルへの展開に向けた基盤整備を行った。R7年度は、既存研究で用量反応性が示されているエレミシン投与ラット試料を対象にECS解析を実施した。その結果、変異頻度は用量依存的に増加し、エレミシンに特徴的な T>A および T>C の変異スペクトルにも用量反応性が認められた。これにより、ECS解析がラット試料における in vivo 変異原性を定量的に評価し得る可能性が示された。また、次年度以降のFFPEサンプル解析に向け、キノリン曝露 gpt delta ラット肝臓FFPEサンプルを確保し、用量反応評価およびgptアッセイとの比較が可能な基盤を整備した。さらに、DNA抽出条件比較用のFFPE試料を入手し、PacBio Revio のHiFiリードやIllumina社以外のショートリードシーケンサーを用いたecNGS法の技術的展開可能性を検討した。以上より、R7年度はecNGS法の in vivo 用量反応性評価への有用性を示すとともに、FFPEサンプルを用いた本格的解析に向けた試料・技術基盤を整備した。今後は、FFPE由来DNAの品質評価および解析条件の最適化を行い、発がん性予測手法としての妥当性検証へ展開する。

A. 研究目的

先行研究においてラットサンプルに対し ecNGS法が応用可能であることが示されている。本課題においては、R7年度は、先行研究に引き続き用量反応性に関するデータ取得を継続行った。さらに、ecNGS法のFFPEサンプルに対する応用可能性を来年度以降で検証するため、FFPEサンプルを提供いただける組織を調査し、ラット肝臓サンプルの入手に成功するとともに、サンプルの処理方法について検討した。

B. 研究方法

R7年度は、まず in vivo における用量反応性評価へのecNGS法（ECS解析）の適用可能性を検証するため、既存研究において用量

反応性が示されているエレミシンを対象とした解析を実施した。エレミシン投与ラット試料を用い、変異頻度および変異スペクトルの用量依存性を評価することで、ラット試料におけるECS解析の有効性を確認する設計とした。

加えて保存組織への応用を見据え、ecNGS法をホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルへ展開するための基盤整備を進めた。具体的には、固定条件や処理履歴が明確で既存の遺伝毒性データ（gptアッセイ等）と比較可能なサンプル、あるいは作成条件が規定された試験用サンプルを候補とし、解析目的に最も適したサンプル条件を評価した。併せて、PacBio社RevioによるHIFI

リードを用いたECS法応用可能性をデモデータで評価したほか、既存サンプル（ジエチルニトロソアミン処理gptデルタラット肝臓）を用いて、HIFIリードデータを取得した。Illumina社以外の3種のショートリードシーケンサー（DNBSEQ、AVIT、SBX）について原理およびデータ特性を検討し、PECC-seq性能向上への有効性を検証した。

（倫理面の配慮）

動物を用いた実験は、所属機関における「動物実験の適正な実施に関する規定」、わが国における「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」ならびに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に準拠して行った。加えて、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護を配慮の上で実施した。

C. 研究結果

「ecNGS法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」については、R7年度は、まず *in vivo* における用量反応性評価へのECS解析の有用性を検証した。過去の研究において用量反応性が示されているエレミシン投与ラット試料を用いてECS解析を行った結果、エレミシン投与群において変異頻度は用量依存的に増加することが確認された(図1)。また、エレミシンに特徴的とされる T>A および T>C の変異スペクトルについても、用量反応性が認められた(図2)。これらの結果から、ECS解析がラット試料における *in vivo* 変異原性評価に有用である可能性が示唆された。さらに次年度にecNGS法をFFPEサンプルへ適用するための実験体制を整備した。キノリン曝露 gpt delta ラット肝臓 FFPE (3用量+対照) が提供され、用量反応評価および gpt アッセイとの比較を可能とする基盤が確立した。また、抽出条件比較に用いる別ロットFFPEも確保した。さら採用する

ecNGS手法として長鎖リード技術では、PacBio社RevioのHIFIリードがECS法に有用である可能性を検討し、初期設定変更により相補鎖ごとのコンセンサス配列等が取得可能であることをデモデータで確認した。また、既存サンプルを用いて、RevioシーケンサーによるHiFiデータを取得した。DNA断片化として、酵素処理及びビーズ精製による方法を検討したが、どちらもリードの冗長度として適切なデータが得られることが確認できた。得られたHIFIリードからのECSデータ解析法の確立に着手した。ショートリードでは、PECC-seq性能向上を目的に複数機種を評価し、DNBseq及びAVITIシーケンサーについて適応可能性を検討した。両機種とも原理的にシーケンス精度の向上が見込まれ、実データでもIlluminaシーケンサーと比較してエラーの低減が確認できたが、シーケンスプライマーの配列により、相補鎖両鎖のリードの回収が難しいことが判明した。このことよりPECC-seqへの応用が難しいことがわかったが、PCRを用いる他のECS法への応用は可能であり、実際にHawk-Seq法においてDNBseqが使用可能であることを確認した。最近になってRoche社が新たな原理に基づく次世代シーケンサーSBXを開発したという情報を入手し、原理的にシーケンスの正確度が上がることからECS法への応用が期待されるため、来年度引き続き検討を行うこととした。

D. 考察

「ecNGS法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」について、R7年度は主として ecNGS 法の *in vivo* 用量反応性評価に対する有効性検証と、FFPE サンプルへの展開に向けた基盤整備を行った。エレミシン投与ラット試料において、変異頻度および特異的な変異スペクトル (T>A、T>C) が用量依存的に増加したことは、ECS解析が生体内における変異原

性を定量的に捉え得ることを示す重要な知見である。特に、既存の遺伝毒性知見と整合する結果が得られたことから、本手法が発がん性評価に資する指標として機能する可能性が示唆された。

一方、FFPE サンプルでは、ホルマリン固定に伴う架橋構造や人工的塩基修飾に起因するシーケンスエラーが大きな課題となる。本年度は、こうした制約を踏まえた技術的整理を行い、比較可能な FFPE サンプル確保および解析条件検討の方向性を明確化した。今後、抽出法や前処理条件の最適化を通じてアーティファクトを低減できれば、保存試料を活用した遺伝毒性評価の適用範囲が大きく拡張されると期待される。また、PacBio HiFi リードの活用により、従来法では困難であった解析への展開も視野に入る。

さらに、PECC-seqへの応用としては、ロッシュ社の最新機種であるSBXに期待がかかる。

E. 結論

「ecNGS法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」では、R7年度において、まず *in vivo* 用量反応性評価に対する ECS 解析の有効性を検証し、加えて FFPE サンプルへの展開に向けた研究基盤を整備した。過去の研究において用量反応性が示されているエレミン投与ラット試料に対する ECS 解析により、変異頻度および特異的な変異スペクトルが用量依存的に変化することが確認され、本手法がラット試料における変異原性を定量的に評価し得る可能性が示された。

これらの知見を踏まえ、保存試料を対象とした応用展開として、キノリン曝露 gpt delta ラット肝臓 FFPE サンプルおよび検討用 FFPE 試料を確保し、次年度に予定する DNA 抽出条件の比較試験やライブラリ調製条件最適化に向けた体制を構築した。以上より、本年度は、ecNGS 法を用いた *in vivo* 遺伝毒性評価の有効性を示すとともに、

FFPE サンプルでの本格的解析に向けた基盤整備を完了した。今後は、R8年度における FFPE 由来 DNA 特性の定量評価および解析条件の最適化を経て、R9年度の ecNGS 法による FFPE 解析と発がん性予測手法としての妥当性検証へと展開する計画である。従来の PECC-seq での検討に加え、PacBio 社の HiFi リードを用いた手法が、FFPE 由来サンプルを含めた ECS 法として有望である可能性を示すデータが得られたため、今後さらにデータ解析手法の確立を含めた検討を進めたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Morozumi R, Shimizu N, Amimoto T, Yamamoto J, Tsuda M. A chemical labeling method for selective conjugation to DNA 3'-phosphoglycolate termini. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2026. doi:10.1080/15257770.2026.2645371.
2. Yauk CL, et al. Application of error-corrected sequencing technologies for *in vivo* regulatory mutagenicity assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2026;164:1059.
3. 鈴木孝昌. Error-corrected next generation sequencing (ecNGS) の現状. *毒性質問*. 2025;27:50-55.
4. Honda H, Suzuki T, Kitajima M, Kondo NI, Miyata K, Utsumi S, Yamada M. The new era shaped by environmental genome monitoring - symposium of the Japanese environmental mutagen and genome society (JEMS), 2024. *Genes Environ*. 2025, 47: 6.
5. Matsumura S, Hosoi S, Hirose T, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Kawade A, Hakura A, Kakiuchi D, Asakura S, Koyama N, Okada Y, Chikura S, Kimoto T, Masumura K, Suzuki T, Sugiyama KI. Whole genome mutagenicity evaluation using Hawk-Seq™

demonstrates high inter-laboratory reproducibility and concordance with the transgenic rodent gene mutation assay. Genes Environ. 2025, 47: 13.

G.2. 学会発表

1. 鈴木孝昌, 三島雅之, 笠原杏奈, 最上由香里, 高橋華奈子, 佐藤薫, 杉山圭一. ナノボアシークエンサーを用いた簡便迅速な DNA メチル化解析. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
2. 伊澤和輝, 津田雅貴, 諸角涼介, 杉山圭一. ラットサンプルを用いた ECS 解析による用量反応性の検討. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
3. 諸角涼介, 清水直登, 石庭寛子, 井出博, 津田雅貴. ネットアイツメガエルを用いた低線量率放射線による DNA 修復機構依存的影響の解析」日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
4. Ryosuke Morozumi, Naoto Shimizu, Hiroko Ishiniwa, Hiroshi Ide, Masataka Tsuda. Radiation sensitivity dependent on DSB repair mechanism in Xenopus embryos. The 68th Annual Meeting of the Japanese Radiation Research (2025.10)
5. 降旗千恵, 杉山圭一. 鈴木孝昌. 遺伝毒性肝発がん物質の予測に有用な 4 マーカー遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) 第 84 回日本癌学会学術総会, 金沢市 (2025.9)
6. 鈴木孝昌, 三島雅之, 佐藤薫, 杉山圭一, 動物細胞を用いた DNA メチル化検出法の検討, 日本農芸化学会 2026 年度大会, 京都市 (2026.3)
7. 最上由香里, 高橋華奈子, 鈴木孝昌, 伊澤和輝, 三島雅之, 柳井修一, 堀端克良, 小泉修一, 杉山圭一, 佐藤薫, 神経細胞、ミクログリアにおける細胞老化にともなうゲノム変化と表現系の解析, 日本薬理学会第 99 回年会, 仙台市 (2026.3)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

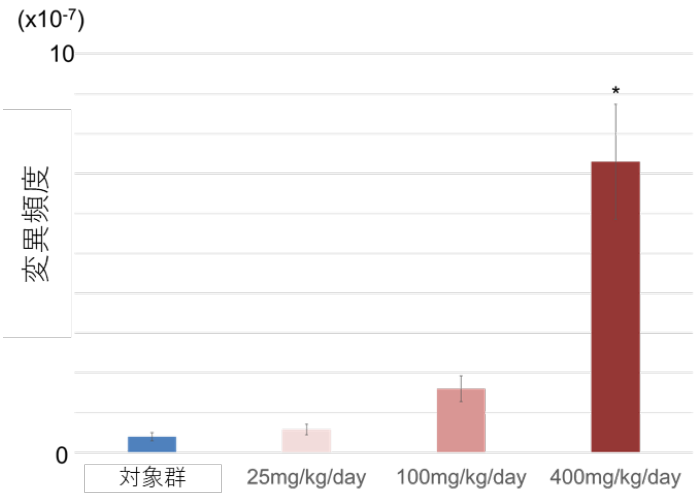


図1 ECS解析によって検出された、エレミシン投与群の変異頻度の上昇

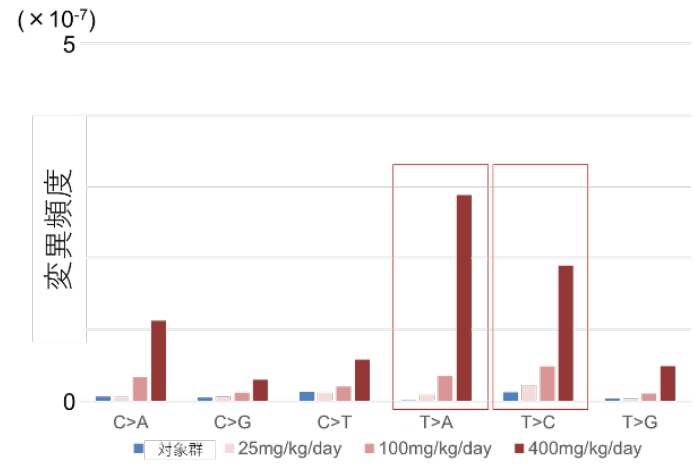


図2 ECS解析によるエレミシンに特徴的な変異の検出