

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 の更なる高精度化のため、従来の FGF シグナルのかく乱モニター用 NLuc に加え、測定ウェル間の補正および細胞毒性モニターとして用いる第二のルシフェラーゼ(内部標準ルシフェラーゼ)を導入する多色ルシフェレースアッセイ系の構築を行った。

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、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・短期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・多国籍）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、試験実施者や実施機関間での再現性の向上および DynaLux/c 法の更なる高精度化を目的とし、FGF シグナル（青色）に加えて、内部標準（赤色）を組み込んだ多色ルシフェラーゼアッセイの構築を目的とする。

B. 研究方法

従来のシグナルかく乱モニター用ルシフェラーゼ（NLuc）に加え、測定ウェル間の補正および細胞毒性モニターとして機能する第二のルシフェラーゼ（内部標準ルシフェラーゼ）を導入した多色ルシフェラーゼアッセイ系の構築を試みた。内部標準ルシフェラーゼには、NLuc とは異なる発光基質で発光する甲虫由来の赤色発光ルシフェラーゼ（SLR3）を用い、これら2種のルシフェラーゼを導入した iPS 細胞を樹立した。さらに昨年度に検討した光学フィルターを用いた多色リアルタイム発光測定を試みた。またこれら

の取り組みに加えて、シグナルかく乱モニターに用いるプロモーターについても検討を行った。

（倫理面への配慮）

該当なし。

C. 研究成果および考察

C-1:2 色発光 iPS 細胞のリアルタイム発光測定

これまでの DynaLux/c では、シグナルかく乱モニター用のルシフェラーゼとして、発光基質 Endurazine を用い青色に発光する NLuc を採用している。今回、第二のルシフェラーゼ（内部標準ルシフェラーゼ）として、NLuc と最大発光波長が最も離れ、異なる発光基質（D-ルシフェリン）で発光する赤色発光ルシフェラーゼ（SLR3）を選定した。昨年度、血清応答配列（serum response element、SRE）制御下で NLuc を、恒常的プロモーター（elongation factor1 α ）制御下で赤色ルシフェラーゼを同時に発現するヒト iPS 細胞を樹立した。今年度は、この細胞を用い、両ルシフェラーゼの発光を経時的に同時測定する多色リアルタイム発光測定を実施した。

まず、NLuc と赤色ルシフェラーゼの発光強度を指標に、D-ルシフェリンの至適濃度を決定した。次に、両者の発光を同時測定できるかを検討するため、ショートパスフィルター（SPF500 フィルター）とロングパスフィルター（R62 フィルター）を併用し、発光の分離を試みた（図1）。その結果、定量的に両ルシフェラーゼの発光を分離できることが明らかとなった。さらに、FGF 添加による FGF シグナル活性化時の発光を測定したところ、NLuc の発光強度は顕著に増加する一方、赤色ルシフェラーゼの発光強度は一定に保たれた。この結果から、両ルシフェラーゼの発光を定量的に同時測定できることを確認した（図2）。

C-2:ルシフェラーゼの発現に用いるプロモーターの検討

iPS 細胞において、本研究で実施しているような転写因子応答配列の応答をモニターするレポーターアッセイの報告はほとんどなく、そのためこの目的に

適したプロモーターも知られていない。現状では、当該研究ではプロメガ社製のミニプロモーターを使用しているが、さらに応答性に優れ、高い発光強度が得られるプロモーターの探索を行った。具体的には、3種類の最小プロモーター(SV40、CMV、AdMLPプロモーター由来)をSREとNLucの間に挿入したベクターを作製した。続いて、これらを iPS 細胞のAAVS1領域にCRISPR-CAS9システムを用いてノックインした安定細胞株を樹立した。FGF 添加により、これまで使用している細胞と応答性および発光強度をリアルタイム発光測定で比較した結果、検討した3種類のプロモーターはいずれも現在使用しているミニプロモーターを上回ることはなく、現状ではミニプロモーターが最も適していることが明らかとなった(図3)。しかし、ミニプロモーターの基底プロモーター活性は決して高くなく、発光測定できるシグナル伝達が限定されるため、今後も継続してミニプロモーターよりも優れたプロモーターの探索が必要と考えられる。

C-3: シングルセル発光イメージングの測定

当該アッセイ系において発光測定で観察されるFGF添加による発光強度の一過的な増加(すなわちFGFシグナルの活性化)については、各細胞が同期して活性化しているのか、あるいは非同期的に個別に活性化しているのかは、光電子増倍管を検出器とするKronosHTでは明らかにできない。活性化の同期性の有無は、今後の毒性発現機序を考察する上で極めて重要な知見になる。そこで高感度 CCD カメラを検出器とする発光イメージング装置を用いて、各細胞における発光強度の変化をリアルタイムに測定した。細胞にはDynaLux/cで使用しているSRE-NLucを発現するiPS細胞を用いた。各細胞の発光強度を定量化した結果、一部の細胞では同期しない挙動が見られたものの、大部分の細胞は測定開始約4時間後にピークを有する発光キネティクスを示すことが明らかとなった(図4)。この結果から、DynaLux/cで観察されるFGFシグナルは、主として各細胞が同期的に活性化される現象であることが明らかとなった。

D. 結論

試験法の精度向上を目的として、多色ルシフェラーゼアッセイ系の構築を行い、異なる発光基質に対応する2種類のルシフェラーゼを同時にリアルタイムで測定可能な手法を確立した。本手法の導入により、測定精度が向上するとともに、細胞毒性や測定誤差を補正するための新たな内部基準の導入が可能となった。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyata, R., Suzuki, M., Okazaki, Y., Iwai, K., Nishiwaki, N. and Nakajima Y. “Takeda G protein-coupled receptor 5 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by pinocembrin and pinostrobin isolated from *Lindera sericea*.” *Int. J. Mol. Sci.* (2026) 27, 2045.
2. Seki, K., Kariya, K., Miyata, R., Sasaki, D., Kobayashi, Y., Ueno, K., Yanagita, R., Tahara, Y., Nakajima, Y. and Ishihara, A. “Identification of new cyclocircadins from *Cyclocybe erebia* and their effects on the circadian rhythm of human osteosarcoma cells.” *J. Nat. Prod.* (2026) 89, 421-432.
3. Sasaki, D., Kusamori, K., Itakura, S., Abe, H., Nakajima, Y. and Nishikawa, M. “Future prospects for edible plant-derived nanoparticles as new functional food ingredients.” *Food Sci. Technol. Res.* (2026) 3, 219-233
4. Watthaisong, P., Kantiwiriyanitch, C., Jitkaroon, W., Phintha, A., Klayparn, I., Lawan, N., Kamutira, P., Sasaki, D., Visitsatthawong, S., Maenpuen, S., Tinikul, R., Sucharitakul, J., Nishihara, R., Niwa, K., Nakajima, Y., Ohmiya, Y. and Chaiken, P. “Red-shifted d-luciferin analogues and their bioluminescence characteristics.” *RSC Chem. Biol.* (2026) 7, 67-80.
5. Chen, X., Rahman, A., Kitada, K., Wang, Y., Nakajima, Y., Liu, C., Taoka, R. and Nishiyama, A. “High salt-induced osmotic stress differentially

modulates hepatocellular and renal carcinoma cell proliferation.” Front. Oncol. (2025) 15, 1693591.

6. Murayama, K., Mizota, K., Matsuura, R., Okubo, Y., Nakajima, Y., Suzuki, A. and Fukuda, J. “Developmental toxicity assay based on real-time monitoring of fibroblast growth factor signal disruption in human induced pluripotent stem cells.” J Vis. Exp. (2025) 224.
7. Miyata, R., Tabei Y., Abe, H., Utsumi, K., Fukuzaki, S., Azuma, S., Takaishi, Y., Kato, T. and Nakajima, Y. “Analysis of active components and NRF2 activation in olive leaf pressurized water extract.” Luminescence (2025) 40, e70312.

2.学会発表

1. Okubo Y., Mizota K., Murayama K., Matsuura R., Mootha A., Kitajima S., Hirabayashi Y., Nakajima Y., Fukuda J.: Continuous Monitoring of Signal Disruption in Human iPSCs for Developmental Toxicity Assay. 20th INTERNATIONAL CONGRESS OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY (2025.6.18)San Juan
2. Okubo Y., Murayama K., Matsuura R., Mootha A., Hirabayashi Y., Nakajima Y., Fukuda J.: Real-time Monitoring of Signal Disruption in Human iPSCs for Toxicity Assay. Joint Meeting of JSCB 77th & JSDB 58th(2025.7.16-17)名古屋
3. 村山航己, 佐藤 花音, 松浦利絵子, Archana Mootha, 平林容子, 中島芳浩, 大久保佑亮, 福田淳二:ヒトiPS細胞を用いたシグナルかく乱指標による精巢毒性物質の評価、第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.2)沖縄
4. 佐藤花音, 村山航己, 松浦利絵子, Mootha Archana, 平林容子, 中島芳浩, 大久保佑亮, 福田淳二:ヒトiPS細胞を用いた新型コロナウイルス感染症治療薬のシグナルかく乱を基にした発生毒性評価、第52回日本毒性学会学術年会 (2025.7.2)沖縄
5. 大久保佑亮, 松浦利絵子, 村山航己, 佐藤 花音, 石川亜佐美, 中元颯馬, 平林容子, 中島芳浩, 福田淳二:シグナルかく乱に着目した in vitro 発生毒性試験とそのリスク評価への展開、第 65 回日本先天異常学会学術集会 (2025.7.27) 伊勢
6. 村山航己, 佐藤 花音, 松浦利絵子, 石川亜佐美, 中元颯馬, 平林容子, 中島芳浩, 大久保佑亮, 福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いたシグナ

ルかく乱指標による精巢毒性物質の評価、第65回 日本先天異常学会学術集会 (2025.7.25) 伊勢

7. 村山航己, 佐藤 花音, 松浦利絵子, 石川亜佐美, 中元颯馬, 平林容子, 中島芳浩, 大久保佑亮, 山田隆志, 福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱指標による生殖毒性物質の評価、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.1) 横浜
8. 佐藤 花音, 村山航己, 松浦利絵子, 中元颯馬, 石川亜佐美, 平林容子, 中島芳浩, 大久保佑亮, 山田隆志, 福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱に基づく新型コロナウイルス感染症治療薬の発生毒性評価、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.1) 横浜
9. 中元颯馬, 村山航己, 佐藤花音, 松浦利絵子, 石川亜佐美, 平林容子, 中島芳浩, 福田淳二, 大久保佑亮, 山田隆志: ヒトiPS細胞を用いたPFASのシグナルかく乱作用を基にした発生毒性評価:PFAS への適用性と信頼性の検証、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.1) 横浜

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

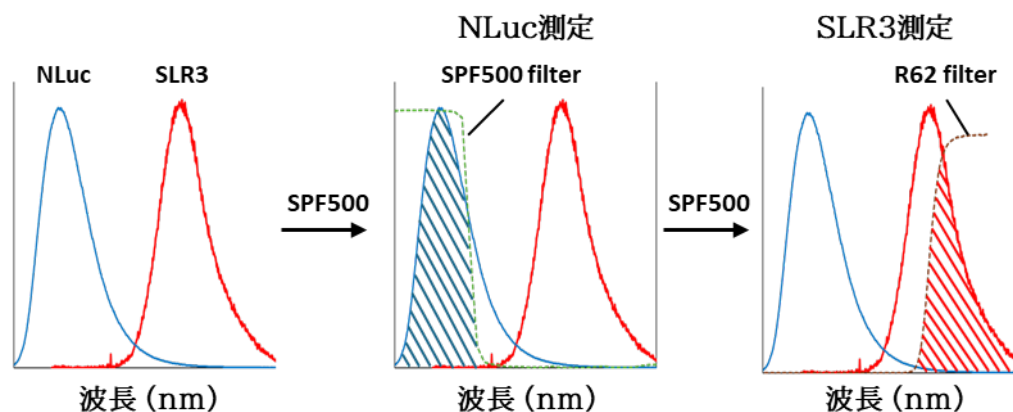


図 1:2種類の光学フィルターを用いた NLuc と SLR3 の測定。最初にショートパスフィルターである SPF500 を用いて NLuc の発光(青色斜線部分)を測定、続いてロングパスフィルターである R62 を用いて SLR3 の発光(赤色斜線部分)を測定する。DynaLux/c で用いている発光測定装置(KronosHT)には、これらのフィルターが組み込まれており、自動的に連続した測定が可能である。

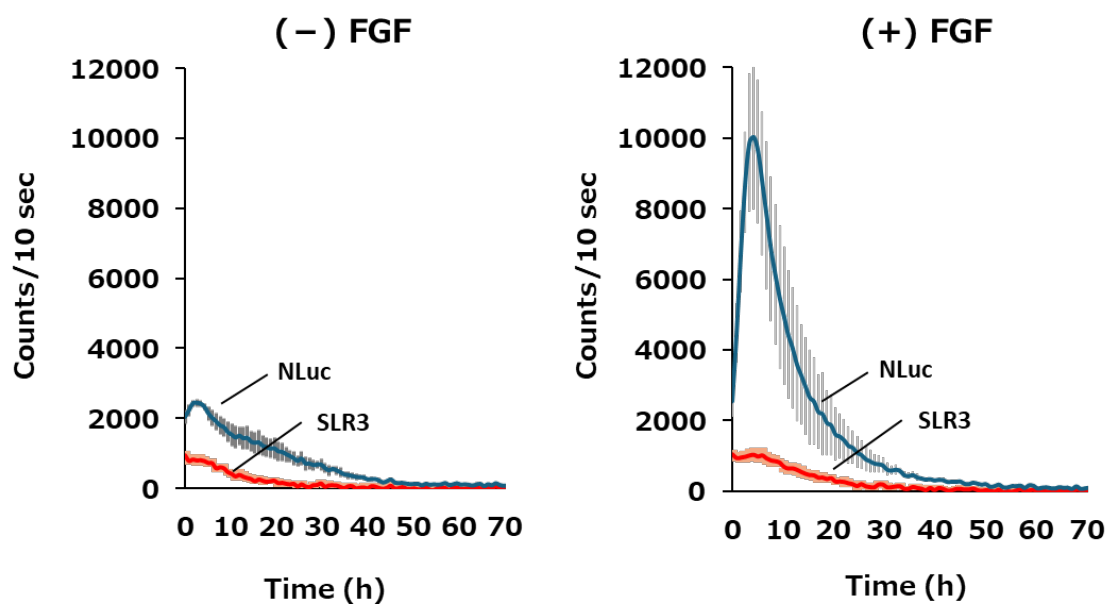


図 2:2色発光 iPS 細胞を用いた多色リアルタイム発光測定の結果。図1に示した方法に従い、NLuc(青線)および SLR3(赤線)の発光を経時的に測定した。左図は FGF 無添加、右図は FGF を添加した細胞の発光測定結果を示す。

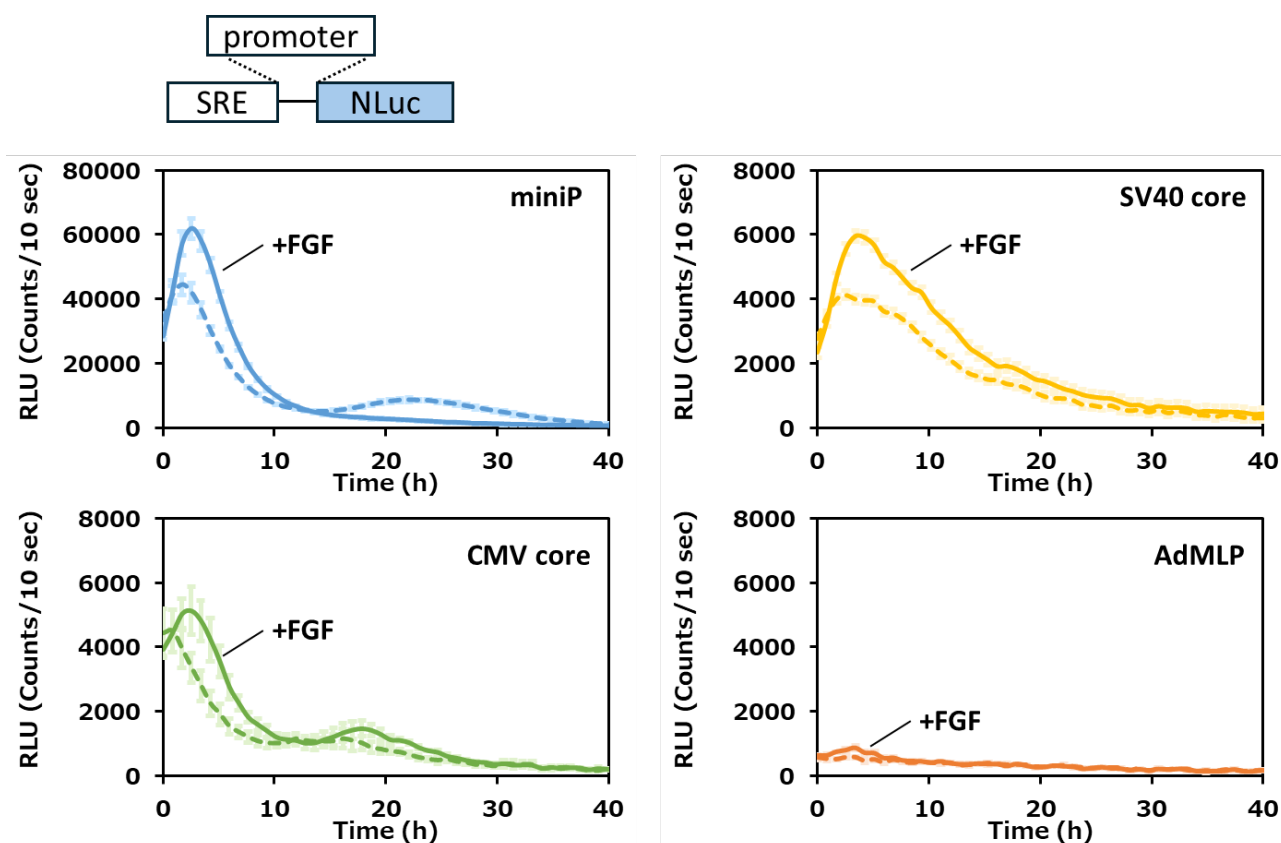


図 3: ルシフェラーゼ発現用プロモーターの検討。3 種類の最小プロモーター (SV40、CMV、AdMLP プロモーター由来) を SRE と NLuc の間に挿入したベクターを作製し、これらを AAVS1 領域に挿入した iPS 細胞を樹立した。各細胞のリアルタイム発光測定結果を示す。

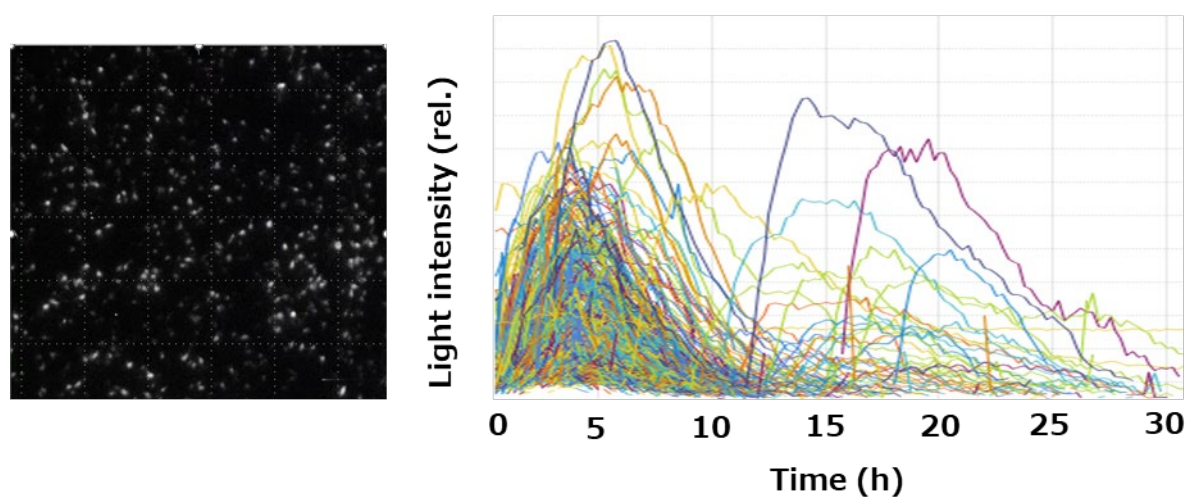


図 4: SRE-NLuc iPS 細胞のシングルセル発光イメージング。SRE-NLuc iPS 細胞に FGF を処理し、30 時間発光イメージングを行った。左図は測定開始約 4 時間後のイメージング画像、右図は各細胞の発光強度の定量結果を示す。