

令和 5 ～ 7 年度厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

DNA 損傷分析 — 簡便な DNA 損傷（遺伝毒性）評価系の開発 —

研究分担者 戸塚 ゆ加里 星薬科大学

研究要旨

本研究は、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的に、喫煙者・受動喫煙者の生体試料（口腔内細胞等）を用いて、簡便に DNA 損傷（遺伝毒性）を評価する手法を開発することを目指したものである。

令和 5 年度には、口腔内細胞を用いた評価系の構築に向けた基盤調査として、DNA 試料採取・保存用器具および DNA 損傷指標の文献調査を行った。試料採取にはマウイディーエヌエーテクノロジー社の iSWAB DNA Collection Kit が、簡便性・DNA 回収効率の点で適していると判断した。また PubMed による文献検索の結果、加熱式・電子たばこの口腔内細胞を用いた評価指標として、DNA 付加体（ γ -OH-Acr-dGuo、AP site など）に加え、小核試験を遺伝毒性指標とする報告が複数存在することを確認した。

令和 6 年度には、文献調査を踏まえて小核試験法の確立を行った。マウス正常肝臓由来細胞に陽性対照物質であるメタンスルホン酸エチル（EMS）を曝露し、ギムザ染色後に小核出現頻度を評価したところ、EMS 曝露により小核出現頻度の上昇が認められた。標本作製に用いる細胞数を検討した結果、 5×10^5 個以上を用いることで迅速な計数が可能であった。

令和 7 年度には、より迅速・客観的な評価系として、 γ -H2AX および Phospho-ATR/Chk1 を指標とした DNA 損傷応答評価系を構築した。ヒト胎児腎細胞およびマウス肝正常細胞に、EMS（直接変異原）およびベンゾ[a]ピレン（B[a]P、代謝活性化系 Rat S9 mix 併用、間接変異原）を 24 時間曝露して解析した。その結果、 γ -H2AX 蛍光免疫染色では EMS 曝露群で核内に明瞭なドット状の foci が認められ、核あたり平均 foci 数は対照群 3 に対しヒト胎児腎細胞で 21、マウス肝正常細胞で 12 へと統計学的に有意に増加した。ウェスタンブロッティングでは、EMS および B[a]P の両物質で Phospho-ATR（Ser428）および Phospho-Chk1（Ser345）の発現が認められ、特に EMS では Phospho-Chk1 のバンド強度が濃度依存的に増強した。

以上より、本 3 か年を通じて、DNA 損傷を「損傷部位の可視化と foci の定量」および「細胞内シグナル伝達の活性化解析」の両面から多角的に評価できる、迅速・簡便・定量的な遺伝毒性評価基盤を構築した。今後は口腔内細胞等の生体試料への適用を進め、喫煙環境による DNA 損傷性を定量的に評価することで、生活習慣病やがんの予防に貢献する実用的なスクリーニング系の確立を目指す。

A. 研究目的

これまで、紙巻たばこについては受動喫煙による健康影響が明らかになっているが、加熱式たばこについては、主流煙にニコチンや発がん性物質が

含まれることは明らかであるものの、現時点では受動喫煙による長期的な健康影響を予測することは難しい状況である。このような状況を踏まえ、健康増進法の改正において、加熱式たばこによる

受動喫煙がヒトの健康に及ぼす影響に関する調査研究を一層推進し、可能な限り早期に結論を得るよう附帯決議がなされた。

そのため、疾患が認められていない喫煙者・受動喫煙者から得られる、侵襲のない生体試料をもとに、有効なバイオマーカー分析手法を開発・探索する必要がある。また、曝露以外の炎症・臨床・影響（酸化ストレス、DNA 付加体など）の評価に有効なバイオマーカーの抽出も求められる。そこで本研究分担（DNA 損傷分析）では、口腔内細胞等の生体試料を用いて加熱式たばこ曝露の指標となる DNA 損傷（遺伝毒性）を簡便に評価する手法の開発を目的とし、文献調査による評価指標の選定（令和 5 年度）、小核試験法の確立（令和 6 年度）、および γ -H2AX・Phospho-ATR/Chk1 を指標とした DNA 損傷応答評価系の構築（令和 7 年度）を順次進めた。本 3 か年で検討した評価手法の概要を Table 1 に示す。

B. 研究方法

B-1. 文献調査と試料採取・評価指標の選定（令和 5 年度）

口腔内細胞を用いた評価系の構築に向け、まずインターネット検索により DNA 試料採取・保存用器具を調査し、本研究に適した物品を選定した。次に、曝露指標として適当な DNA 損傷マーカーを選定するため、PubMed を用いて文献検索を実施した。欧米では加熱式たばこよりも電子たばこの普及が進んでいることから、検索ワードに電子たばこ（e-cigarettes）も加えて検索した。

B-2. 小核試験法の確立（令和 6 年度）

前年度の文献調査において、口腔内細胞を用いた小核試験による喫煙の有害性評価の報告を複数確認したことから、当研究室における小核試験手法の確立を行った。マウス正常肝臓由来細胞を 24 well plate に播種・培養した後、陽性

対照物質である EMS を 0、125、250 mg/mL で 24 時間曝露した。曝露後、PBS 洗浄および 0.25% トリプシン処理でシングルセル化して回収し、0.075 M 塩化カリウム溶液による低張処理（37℃、3 分）、固定液（メタノール：酢酸＝3:1、次いで 99:1）による固定を経てスライド標本を作製した。ギムザ染色後、各濃度あたり 2,000 個の細胞を顕微鏡下で計数し、小核を有する細胞の出現頻度で評価した。あわせて、観察に適した細胞数を検討するため、異なる細胞数で標本作製・染色して観察した。

B-3. DNA 損傷応答評価系の構築（令和 7 年度）

ヒト胎児腎細胞（HEK293FT）およびマウス肝正常細胞を用い、化学物質曝露による DNA 損傷応答を評価した。曝露物質には、直接変異原である EMS、および代謝活性化を要する間接変異原である B[a]P（ラット肝臓抽出物 Rat S9 mix 75 μ g/mL 併用）を用い、各細胞に 24 時間曝露した。

（1） γ -H2AX 解析（蛍光免疫染色）：DNA 二重鎖切断を評価するため、EMS（2 mM）曝露後に 4% PFA で固定・透過化処理を行い、一次抗体（Anti-Phospho-Histone H2A.X（Ser139）Rabbit mAb、1:200）および二次抗体（Alexa 647 標識抗体、1:200）で反応させ、DAPI（1 μ g/mL）で核染色した。オールインワン蛍光顕微鏡（BZ-X800）で核内の γ -H2AX foci を観察し、画像解析により核あたりの平均 foci 数を算出した。

（2）Phospho-ATR/Chk1 発現解析（ウェスタンブロッティング）：DNA 損傷チェックポイント制御の活性化を確認するため、EMS（1、2、4、5 mM）および B[a]P（1、5、10 μ g/mL、S9 mix 併用）曝露後の細胞からタンパク質を抽出し、Phospho-ATR（Ser428）および Phospho-Chk1（Ser345）を標的としてウェスタンブロッティングを実施した。

(倫理面への配慮) 該当なし。

C. 結果及び考察

C-1. 文献調査による試料採取法・評価指標の選定 (令和 5 年度)

DNA 試料採取・保存用器具として、マウイディーエヌエーテクノロジー社の iSWAB DNA Collection Kit が、試料採取の簡便性・DNA 回収効率の点で適していると判断した。本キットは口腔サンプルを室温で月単位で保存でき、ヒト口腔細胞から 15~30 µg の DNA を回収可能とされ、DNA 付加体検出を数回行うのに十分な量である。

文献検索では、“buccal cells”と“heated cigarette (heated tobacco products)”で 2 件、検索ワードを“e-cigarettes”に変更すると先の 2 件を含む 9 件が得られた。このうち DNA 付加体を検出していたものは 2 件で、アクロレイン付加体 γ -OH-Acr-dGuo (Cheng G. et al., Carcinogenesis, 2022) と、DNA 損傷から生じる Apurinic/Apyrimidinic Sites (AP site) を誘導体化して検出するもの (Guo J. et al., Chem Res Toxicol, 2021) であった。一方、9 報のうち 3 報が小核を遺伝毒性指標としており、Tadin A. et al. (J Xenobiotics, 2024) では、小核を有する口腔粘膜細胞数が非喫煙者 1.22 ± 1.00 に対し、紙巻たばこ 1.95 ± 1.46 、電子たばこ 1.85 ± 0.58 、加熱式たばこ 1.40 ± 1.17 であった。同報告では、加熱式たばこにおいても nuclear bud、binucleated cells、karyorrhexis、karyolysis、condensed chromatin、pyknosis が非喫煙者と有意に異なると報告されている。このほか、マロンジアルデヒド (脂質過酸化) や DNA メチル化を指標とする報告、また紙巻たばこ喫煙に相関する DNA 付加体として etheno-dA が知られている。

C-2. 小核試験法の確立 (令和 6 年度)

小核試験の結果、顕微鏡観察下で小核の出現を確認でき、EMS 曝露により対照群と比較して小核出現頻度の上昇が認められた。また、標本作製に用いる細胞数を検討した結果、細胞数が少ないと

スライドに滴下した細胞溶液が広がって計数に時間を要するのに対し、 5×10^5 個以上 (あるいは 1×10^6 個) を用いることで迅速に計数できることがわかった。

C-3. DNA 損傷応答評価系の構築 (令和 7 年度)

(1) γ -H2AX 蛍光免疫染色: EMS 曝露群において核内に明瞭なドット状の γ -H2AX foci が認められ、DNA 二重鎖切断の発生を視覚的に確認できた。核あたりの平均 foci 数は、ヒト胎児腎細胞で対照群 3 に対し EMS 曝露群 21 ($p < 0.001$)、マウス肝正常細胞でも対照群 3 に対し EMS 曝露群 12 ($p < 0.005$) と、いずれも統計学的に有意な増加を示した (Table 2)。本解析は画像解析ソフトを用いた自動解析により foci 形成を客観的に定量でき、信頼性が高く迅速な評価が可能である。

(2) Phospho-ATR/Chk1 発現解析: 直接変異原 EMS (1~5 mM) の曝露、および代謝活性化系 (S9 mix) を併用した間接変異原 B[a]P (1~10 µg/mL) の曝露のいずれにおいても、Phospho-ATR (Ser428) および Phospho-Chk1 (Ser345) の発現が確認された。特に EMS 曝露下では、Phospho-Chk1 (Ser345) のバンド強度が濃度依存的に増強していた。

D. 考察

ゲノムの初期損傷を捉える指標として γ -H2AX 解析を実施した。 γ -H2AX は DNA 二重鎖切断の直後に損傷部位へ集積する。本検討により、蛍光顕微鏡下で γ -H2AX foci を明瞭なシグナルとして識別できることが確認でき、画像解析技術を用いることで解析を自動化・客観化できる可能性も示唆された。これは、多検体を迅速に処理する必要がある生体試料スクリーニングにおいて大きな利点となる。さらに、DNA 損傷から修復への細胞内シグナル伝達の活性化を評価するための Phospho-ATR/Chk1 発現解析では、ATR およびその下流因子である Chk1 双方のリン酸化が確認された。特に EMS 曝露下での Phospho-Chk1 の用量相関的応答は、ATR を介した DNA 損傷チェック

ポイントシグナルが効率的に増幅され、細胞が鋭敏に応答していることを示唆している。このことから、本評価系は損傷の有無を判定するだけでなく、曝露の程度を定量的に反映し得るバイオマーカーとしても機能することが示された。代謝活性化系（S9 mix）を要する B[a]P に対しても陽性応答が得られたことから、直接・間接変異原の双方に対して有効な基盤技術となり得る。

また、令和 6 年度に確立した小核試験は、異数性誘発物質と染色体構造異常誘発物質の双方を検出できる、比較的簡便な遺伝毒性解析手法である。出現する小核の大きさは染色体異常の違いにより異なり、紡錘糸異常により生じる異数性異常由来の小核は比較的大きく、DNA 損傷により生じる構造異常由来の小核は小さいことが知られている。したがって、小核出現の有無に加えて小核の大きさの程度を評価することで、遺伝毒性メカニズムの解明につながる可能性がある。複数の先行研究で口腔内細胞を用いた小核試験が喫煙の有害性評価に用いられていることから、本研究課題における有効な手法の一つと考えられる。以上のことから、本研究で検討した一連の評価法は、加熱式たばこ曝露に伴う DNA 損傷の評価に有効な指標になると考えられる。

E. 結論

本 3 か年の研究分担（DNA 損傷分析）では、喫煙者・受動喫煙者の生体試料（口腔内細胞等）を用いた簡便な遺伝毒性評価手法の開発を目指し、文献調査による試料採取法・評価指標の選定（令和 5 年度）、小核試験法の確立（令和 6 年度）、および γ -H2AX・Phospho-ATR/Chk1 を指標とした DNA 損傷応答評価系の構築（令和 7 年度）を行った。

その結果、DNA 損傷を「損傷部位の可視化と foci の定量」および「細胞内シグナル伝達の活性化解析」という 2 つのアプローチで多角的に捉えることが可能となり、迅速・簡便かつ定量的に遺伝毒性を評価できる基盤技術を確立した。今後は、本

研究で確立した評価基盤をベースとして、実際の口腔内細胞などの生体試料への適用最適化を進める。これらを通じて、喫煙者および受動喫煙者の健康リスクを科学的根拠に基づいて迅速に判定できる実用的なスクリーニング系の確立を目指し、生活習慣病やがんの予防に貢献していきたい。

F. 研究発表

【令和 5 年度】

1. 論文発表

1) Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, Totsuka Y, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. *Biomolecules*. 2024;14:36.

2. 学会発表

1) 戸塚ゆ加里. 生体を模倣した in vitro 遺伝毒性評価法. 日本薬学会第 144 年会（2024 年 3 月、横浜）

2) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルの遺伝毒性評価とそのメカニズムの解析. 日本酸化ストレス学会（2023 年 12 月、川崎）

3) Totsuka Y. Elucidation of driver adducts of cancer development using comprehensive analysis of DNA adducts. The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund（2023 年 11 月、東京）

4) 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、戸塚ゆ加里. 加熱式たばこの遺伝毒性評価. 第 52 回環境変異原学会（2023 年 11 月、福岡）

5) 石ヶ守里加子、澤田琉那、前嶋愛美、小宮雅美、大野彰子、戸塚ゆ加里. アドバンストナノマテリアルの in vitro 遺伝毒性評価. 第 52 回環境変異原学会（2023 年 11 月、福岡）

- 6) Kohei Watanabe, Yasuyo Shimoda, Masami Sakano, Yukari Totsuka, Koichi Kato. メチルアミン・ジクロラミン由来の大腸炎関連発がんメカニズムの解明. 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
- 7) 白鳥修平、小宮雅美、魏民、鈴木周五、鰐渕英機、Jiri Zavadil、渡部浩平、戸塚ゆ加里. 職業性胆管がん原因物質であるハロゲン系炭化水素のドライバーアダクト探索. 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
- 8) 本橋実奈、別役雄毅、高村岳樹、小宮雅美、佐々彰、戸塚ゆ加里. アルコール発がんにおけるドライバーアダクトの探索と変異誘発メカニズムの解明. 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
- 9) Yukari Totsuka, Masami Komiya, Tomonari Matsuda, Mamoru Kato. Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers. 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
- 10) Totsuka Y. Prospects for DNA adductomics analysis. 54th EMGS (2023 年 9 月、シカゴ・米国)
- 11) 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、戸塚ゆ加里. 加熱式たばこの遺伝毒性評価. がん予防学術大会 2023 (2023 年 9 月、金沢)

【令和 6 年度】

1. 論文発表

- 1) Hasegawa S, Shoji Y, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Mimaki S, Tsuchihara T, Totsuka Y. Whole genome sequencing analysis of model organisms elucidates the association between environmental factors and human cancer development. *Int J Mol Sci.* 2024;25.
- 2) Watanabe K, Komiya M, Obikane A, Miyazaki T, Ishino K, Ikegami K, Hashizume H, Ishitsuka Y, Fukui T, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Totsuka Y. Development of a genotoxicity/carcinogenicity

assessment method by DNA adductome analysis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2024 Oct;899:503821.

- 3) Imai T, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, Totsuka Y. Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems. *J Toxicol Sci.* 2024;49(10):425-434.

2. 学会発表

- 1) 戸塚ゆ加里. DNA 付加体研究の過去・現在・未来. 令和 6 年日本環境変異原ゲノム学会公開シンポジウム (2024 年 6 月 1 日、東京)
- 2) Yukari Totsuka. New Horizons Of DNA Adductome For Exploring Environmental Causes Of Cancer. 第 42 回札幌国際がんシンポジウム (2024 年 6 月 6-8 日、札幌)
- 3) Yukari Totsuka. Landscape of mutational signatures observed in laboratory animal tumors induced by various carcinogens. The 8th JCA-AACR Special Joint Conference (2024 年 6 月 28-30 日、京都)
- 4) 戸塚ゆ加里、小宮雅美、煙山紀子、加藤護. Genotoxicity induced in mice lungs by inhalation exposure to heated tobacco products. 第 83 回日本癌学会総会 (2024 年 9 月 19-21 日、福岡)
- 5) 戸塚ゆ加里. DNA 付加体の網羅的解析を用いた発がん要因およびメカニズムの解明. アンチエイジング研究シンポジウム (2024 年 10 月 25-26 日、東京)
- 6) 戸塚ゆ加里. 環境要因による DNA 付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索. 環境エピゲノミクス研究会 (EEG) 2024 春季ネットシンポジウム (2024 年 11 月 9 日、Web 開催)
- 7) 戸塚ゆ加里. DNA 付加体解析を基軸とした発がん要因およびメカニズムの解明. 第 47 回日本分子生物学会年会 (2024 年 11 月 27-29 日、福岡)
- 8) 戸塚ゆ加里. オルガノイドを用いた遺伝毒性

評価法の開発. 第 85 回 MMS 秋の定例会 (2024 年 12 月 6 日、岡山)

9) 戸塚ゆ加里、石ケ守里加子、牛山明、稲葉洋平、美谷島克宏、煙山紀子. 加熱タバコ製品の吸入曝露によりマウス肺に誘導される遺伝毒性. 第 53 回日本環境変異原ゲノム学会 (2024 年 12 月 7-8 日、岡山)

10) 戸塚ゆ加里、永井桃子、加藤護. 次世代シーケンサーにより環境要因とヒト発がんの関係を解明する. 第 53 回日本環境変異原ゲノム学会 (2024 年 12 月 7-8 日、岡山)

11) 石ケ守里加子、柳澤萌、大野彰子、戸塚ゆ加里. マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドナノマテリアルの毒性評価. 第 53 回日本環境変異原ゲノム学会 (2024 年 12 月 7-8 日、岡山)

12) 長谷川晋也、Asmaa Elzawahry、永井桃子、加藤護、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、松田知成、戸塚ゆ加里. N-ニトロソ胆汁酸抱合体の変異シグネチャーの解析. 第 53 回日本環境変異原ゲノム学会 (2024 年 12 月 7-8 日、岡山)

13) 渡部浩平、三好規之、戸塚ゆ加里. 二環芳香族アミンにおける変異スペクトル解析. 第 53 回日本環境変異原ゲノム学会 (2024 年 12 月 7-8 日、岡山)

14) 戸塚ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた化学物質の遺伝毒性評価. 日本薬学会第 145 年会 (2025 年 3 月 27-29 日、福岡)

15) 宮崎飛翔、藤岡正喜、鰐淵英機、美谷島克宏、石ケ守里加子、加藤孝一、戸塚ゆ加里. マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規毒性試験法の開発. 日本薬学会第 145 年会 (2025 年 3 月 27-29 日、福岡)

16) 渡部浩平、下村航平、安藤彩花、佐藤玲香、鈴木千咲、武内まどか、三好規之、小林琢磨、戸塚ゆ加里、加藤孝一、中嶋順一. 二環芳香族アミンにおける遺伝毒性評価. 日本薬学会第 145 年会 (2025 年 3 月 27-29 日、福岡)

17) 本橋実奈、高村岳樹、佐々彰、加藤孝一、中嶋順一、戸塚ゆ加里. アルコール発がんにおける

ドライバーアダクトの探索と変異誘発メカニズムの解明. 日本薬学会第 145 年会 (2025 年 3 月 27-29 日、福岡)

18) 白鳥修平、小宮雅美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、Jiri Zavadil、渡部浩平、戸塚ゆ加里. 職業性胆管がん原因物質であるハロゲン系炭化水素のドライバーアダクト探索. 日本薬学会第 145 年会 (2025 年 3 月 27-29 日、福岡)

【令和 7 年度】

1. 論文発表

1) Betsuyaku Y, Motohashi M, Sassa A, Takamura-Enya T, Totsuka Y. Analysis of Novel DNA Adducts Derived from Acetaldehyde. *Biomolecules*. 2025;15(6):878.

2) Ishigamori R, Ohno A, Fukuhara K, Hasegawa S, Totsuka Y. Genotoxicity assessment of mesoporous silica and graphene oxide in GDL1 cells. *Genes Environ*. 2025;48(1):2.

2. 学会発表

1) 戸塚ゆ加里. 正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月 2-4 日、沖縄)

2) 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚ゆ加里、末水洋志. In vitro 薬剤誘発性リン脂質症評価における HepaSH 細胞の有用性. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月 2-4 日、沖縄)

3) 宮崎飛翔、石ケ守里加子、長谷川晋也、藤岡正喜、加藤孝一、美谷島克宏、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 毒性試験法の開発. 第 38 回発癌病理研究会 (2025 年 8 月 20-22 日、千葉)

4) Yukari Totsuka, Momoko Nagai, Asmaa Elzawahari, Rikako Ishigamori, Shinya Hasegawa, Mamoru Kato. Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers. *EMGS2025* (2025 年 9 月、ニューヨーク・米国)

- 5) 戸塚ゆ加里. 環境発がん因子の解明に向けた変異シグネチャーと DNA 付加体の解析. 第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月 12,13 日、名古屋)
- 6) 小池遥己、小高和大、渋谷優空、関根航、茅野朋子、松本真理子、藤岡正喜、鈴木周五、魏民、戸塚ゆ加里. 有機フッ素化合物 (PFAS) の遺伝毒性評価. 第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月 12,13 日、名古屋)
- 7) Yukari Totsuka. Comprehensive Insights into Environmental Carcinogenesis via DNA Adducts and Genome-wide Mutation Profiling. 第 84 回日本癌学会総会 (2025 年 9 月 25-27 日、金沢)
- 8) 石ケ守里加子、大野彰子、戸塚ゆ加里. マウス肝臓由来オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの遺伝毒性評価. 第 84 回日本癌学会総会 (2025 年 9 月 25-27 日、金沢)
- 9) 長谷川晋也、吉田健一、垣内伸之、渡部光一、川口駿、小川誠司、戸塚ゆ加里. 加熱タバコ製品の吸入曝露による遺伝毒性と変異スペクトラム. 第 84 回日本癌学会総会 (2025 年 9 月 25-27 日、金沢)
- 10) Yukari Totsuka. Decoding Environmental Carcinogenesis for Cancer Prevention: Insights from DNA Adduct and Mutation Profiling. 2025 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (2025 年 10 月、ソウル・韓国)
- 11) 戸塚ゆ加里. 環境要因による DNA 付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索とメカニズムの解明. 第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2025 年 10 月、大阪)
- 12) 戸塚ゆ加里. Screening for genotoxic compounds and study of carcinogenic mechanisms using next-generation sequencing (NGS) and adductome analysis. 第 54 回日本環境変異原ゲノム学会 学会賞受賞講演 (2025 年 11 月 22,23 日、静岡)
- 13) 宮崎飛翔、石ケ守里加子、長谷川晋也、藤岡正喜、加藤孝一、美谷島克宏、戸塚ゆ加里. マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性試験法の開発. 第 54 回日本環境変異原ゲノム学会 (2025 年 11 月 22,23 日、静岡)
- 14) 石ケ守里加子、大野彰子、戸塚ゆ加里. マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの包括的毒性評価. 第 54 回日本環境変異原ゲノム学会 (2025 年 11 月 22,23 日、静岡)
- 15) 長谷川晋也、石ケ守里加子、鈴木周五、大野麻理奈、吉田健一、垣内伸之、渡部光一、川口駿、小川誠司、戸塚ゆ加里. ヒト胎児腎細胞株を用いた Error-corrected NGS による化学物質の変異シグネチャー解析. 第 54 回日本環境変異原ゲノム学会 (2025 年 11 月 22,23 日、静岡)
- 16) 戸塚ゆ加里. オルガノイド技術を用いた環境化学物質影響評価. 日本学術会議主催学術フォーラム (2025 年 12 月、東京)
- 17) 戸塚ゆ加里. ヒトへの外挿性を考慮した新規 in vivo 代替型遺伝毒性評価法の開発. 日本薬学会第 146 年会 (2026 年 3 月 27-29 日、大阪)
- 18) 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚ゆ加里、末水洋志. ヒト肝キメラマウスにおけるメトトレキサートの代謝および腎毒性. 日本薬学会第 146 年会 (2026 年 3 月 27-29 日、大阪)
- 19) 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. 日本薬学会第 146 年会 (2026 年 3 月 27-29 日、大阪)
- 20) 長谷川晋也、石ケ守里加子、高橋賢吾、遠藤瑞葵、戸塚ゆ加里. ヒト胎児腎細胞株を用いた DNA 損傷を指標とした化学物質の変異原性の評価. 日本薬学会第 146 年会 (2026 年 3 月 27-29 日、大阪)
- 21) 今井正彦、小川心音、川西なつき、中山瑞穂、大島正伸、戸塚ゆ加里. 大腸がんモデルオルガノイドを用いた化学物質のプロモーション活性評価法の構築. 日本薬学会第 146 年会 (2026 年 3 月

27-29 日、大阪)

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

Table 1 本研究で検討した DNA 損傷（遺伝毒性）評価手法の概要

年度	検討内容	手法・対象	主な成果
令和 5	文献調査・評価系の基盤調査	iSWAB DNA Collection Kit 、 PubMed 文献調査	DNA 採取器具の選定と評価指標候補（小核・DNA 付加体・ γ H2AX 等）の抽出
令和 6	小核試験法の確立	マウス正常肝臓由来細胞、EMS 曝露、ギムザ染色	EMS 曝露で小核出現頻度の上昇を確認、標本細胞数を最適化（ $\geq 5 \times 10^5$ 個）
令和 7	DNA 損傷応答評価系の構築	ヒト胎児腎細胞・マウス肝正常細胞、EMS/B[a]P (S9 mix 併用) 曝露、 γ -H2AX ・ Phospho-ATR/Chk1	foci の定量とシグナル活性化の両面評価を確立（直接・間接変異原に対応）

Table 2 γ -H2AX foci 解析結果（核あたりの平均 foci 数）

細胞	対照群	EMS 曝露群	有意差
ヒト胎児腎細胞（HEK293FT）	3	21	$p < 0.001$
マウス肝正常細胞	3	12	$p < 0.005$

※EMS（2 mM）24 時間曝露。画像解析により核あたりの平均 foci 数を算出。