

Establishment of a developmental toxicity assay based on human iPSC reporter to detect fibroblast growth factor signal disruption

(ヒトiPSレポーター細胞を用いたシグナルかく乱を
指標とする発生毒性試験法)

福田 淳二



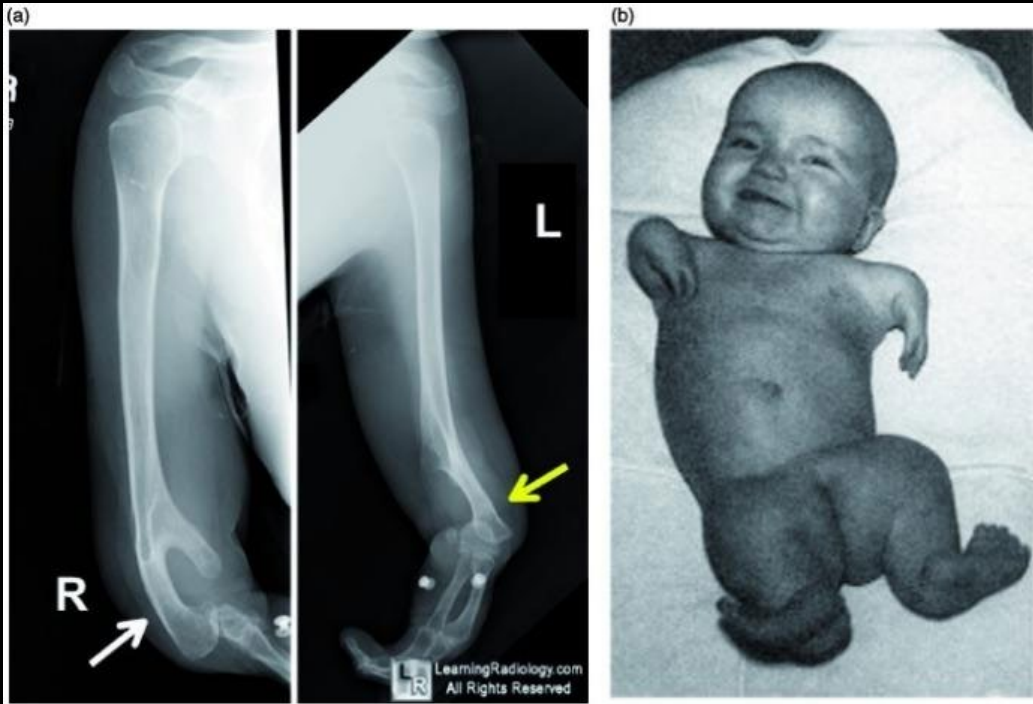
横浜国立大学 教授
KISTEC プロジェクトリーダー
株)TrichoSeeds CEO

発生毒性と現状の試験方法

発生毒性

... 1950年代 サリドマイドによる催奇形性の悲劇

Malformations induced by Thalidomide



Rehman W *et al.*, 2011

動物試験



化学物質の投与



形態を見て
影響の有無を確認

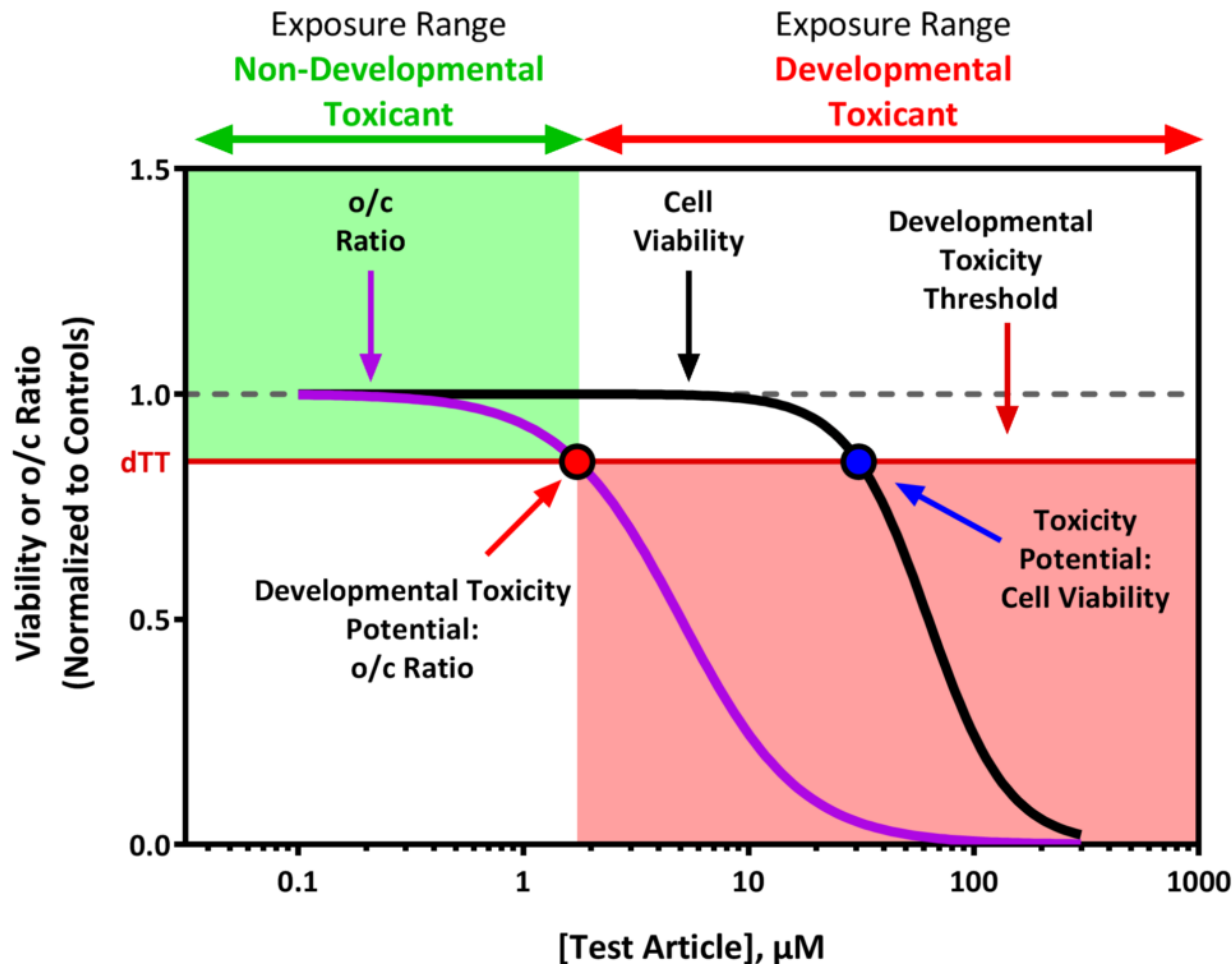
- ・ 世界的な動物愛護のながれ
- ・ ヒトでの予測性
- ・ コストの問題

→動物試験を低減できるin vitro試験法

代表的なin vitro発生毒性試験法(1)

Stemina社(US) devTOX quickPredict

正確度: 87%



オルニチン/シスチン比を指標

オルニチン:

細胞の増殖や生存に関連

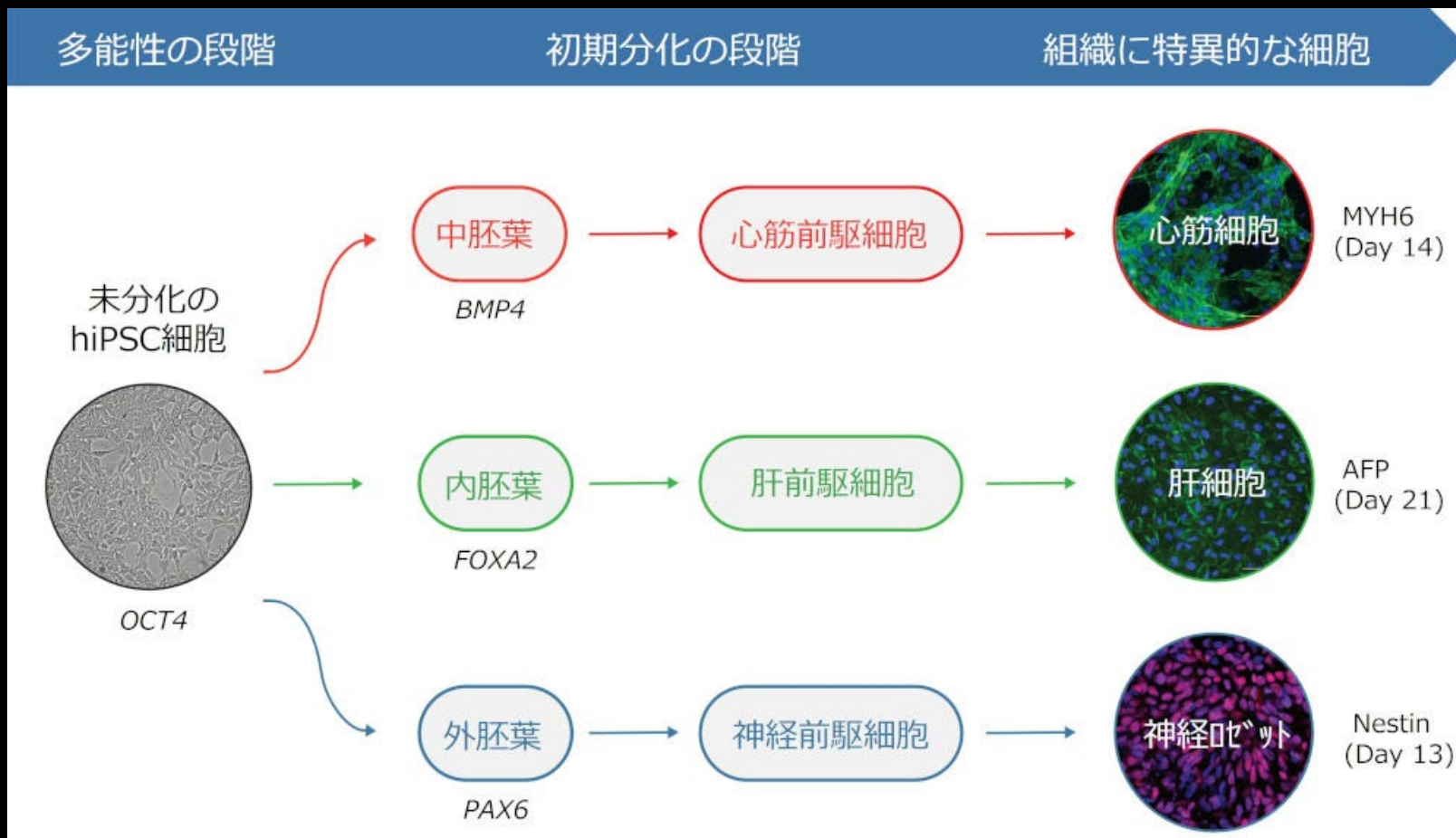
シスチン:

酸化ストレスや細胞保護(グルタチオン合成)に関連

→発生毒性に関連する現象を評価しているか不明

代表的なin vitro発生毒性試験法(2)

Toxys社(EU) ReproTracker 正確度: 85%



分化マーカー発現
と細胞形態を指標

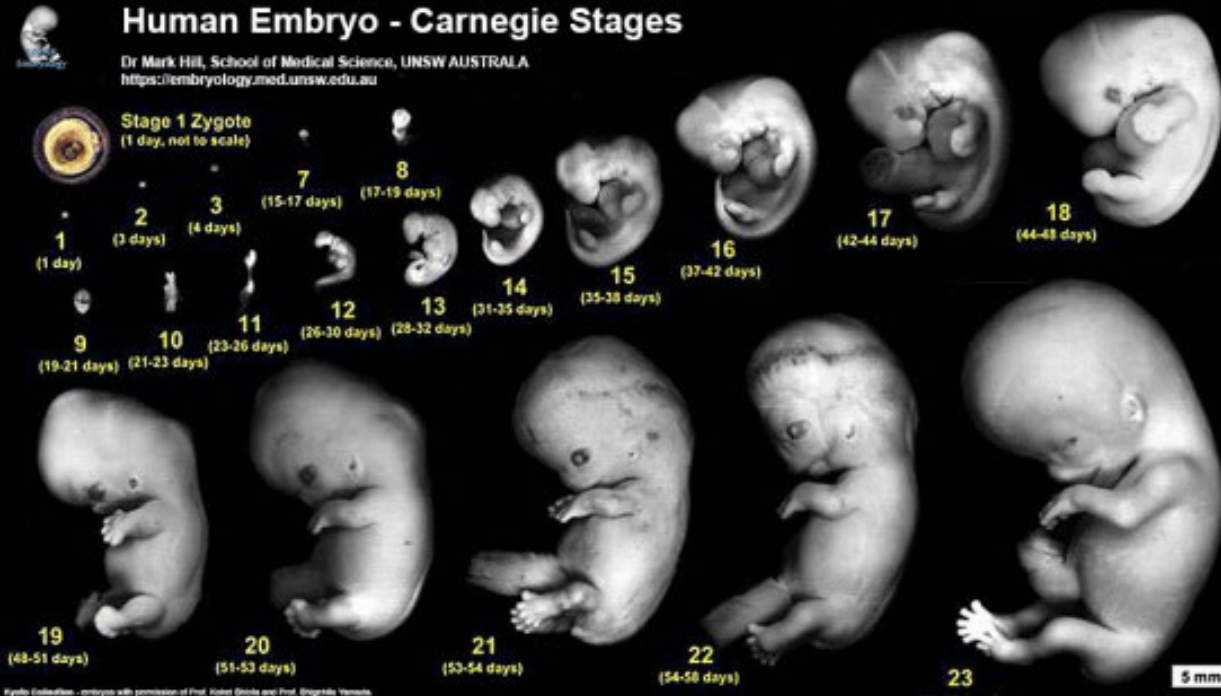
PCRや免疫染色によって
中胚葉(心)、内胚葉(肝)、
外胚葉(神経)への分化を
評価

A. Jamalpoor, et al., Birth Defects Res. 2022

→エンドポイント測定であり他の組織への毒性は不明

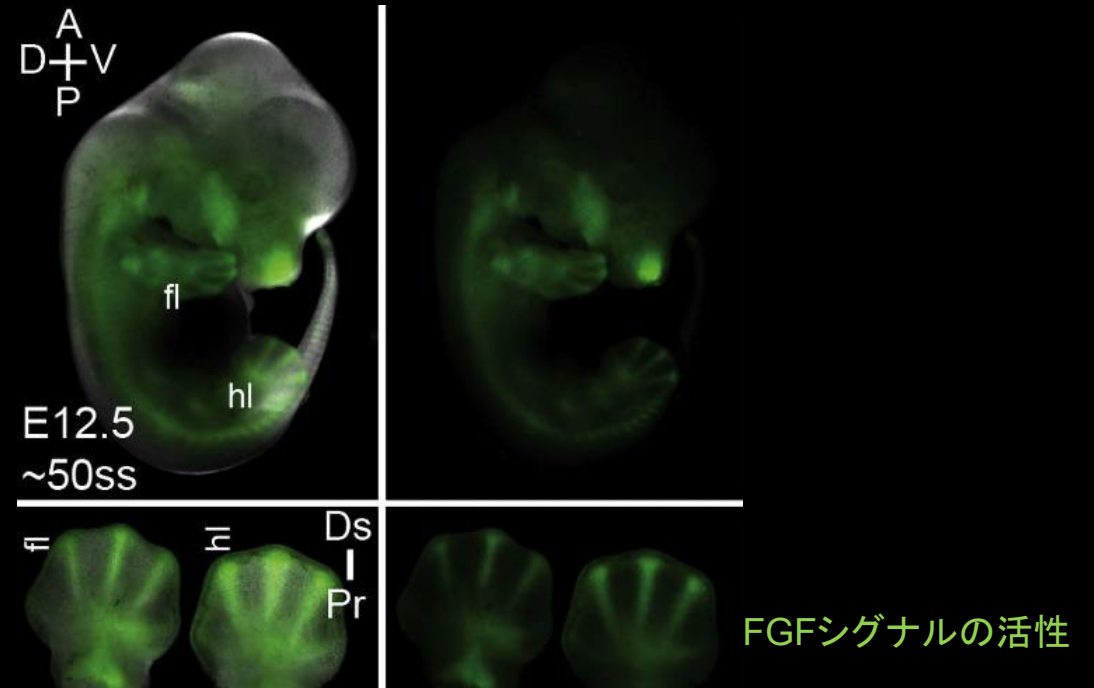
シグナル攪乱を指標に？

ヒトの発生プロセス(外乱に対する堅牢性)



Dr Mark Hill, UNSW Embryology, 2025

組織の形態形成プログラムは細胞内外のシグナル伝達により実行されている



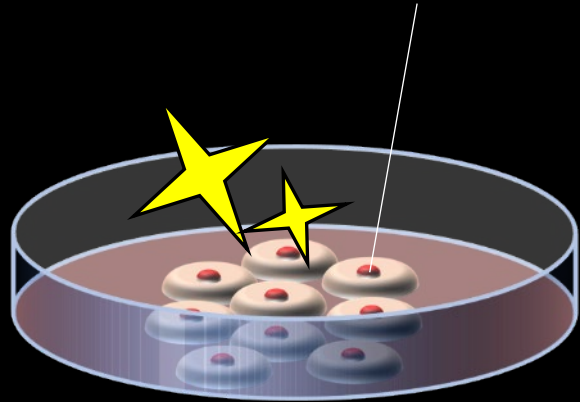
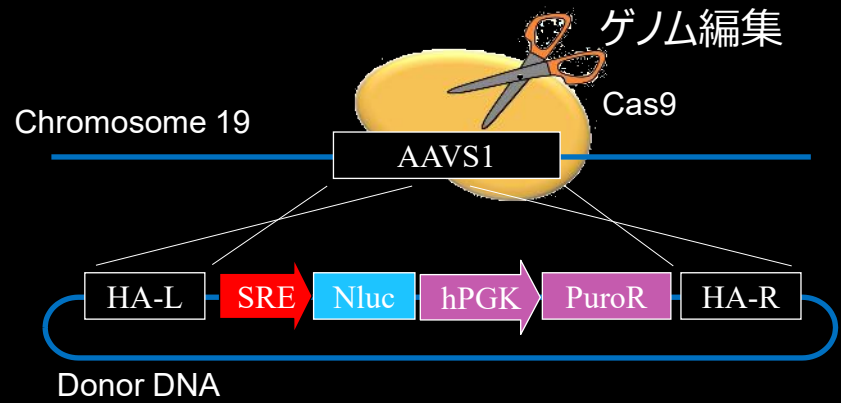
S. M. Morgani, et al. Dev. Biol. 2018

形態形成プログラムの堅牢性
を超える外乱(発生毒性)

==

シグナル攪乱を指標とできるか？
: 本研究の仮説

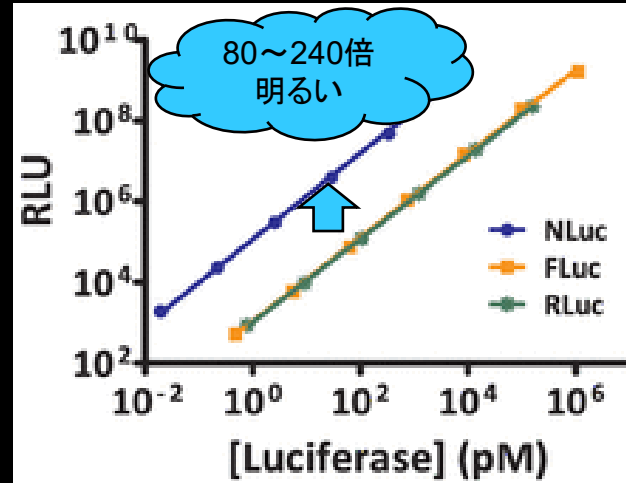
発光レポーター細胞でシグナルの時間変動を検出



ヒトiPSレポーター細胞

SRE : FGF下流の応答配列

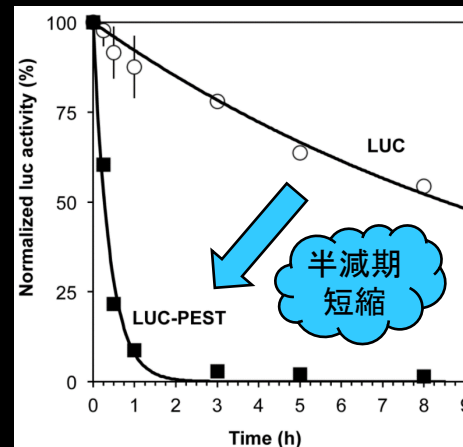
Oplophorus gracilirostris由来ルシフェラーゼ (NLuc)



M. P. Hall et al., *ACS Chem. Biol.* (2012)

Kinetic assayでも
十分な明るさ

PEST配列による半減期短縮



半減期の短縮 (6時間→10~30分)
により、転写活性をより正確に反映

Cesbron, F., et al. *PLoS One* 8, e83660 (2013)

国衛研
大久保先生

シグナル攪乱の定量手順

菅野、博士修了2022年

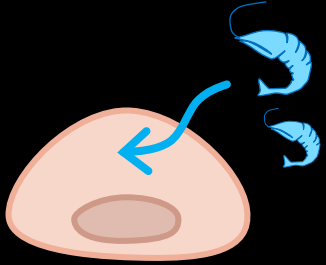
S. Kanno, et al., *iScience*, 2022

S. Kanno, et al., *JBB*, 2022

S. Kanno, et al., *Star Protoc*, 2022

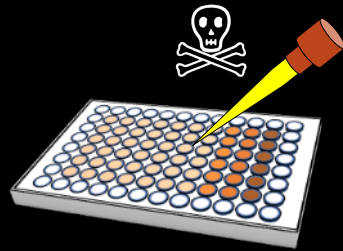
試験手順

発光基質添加

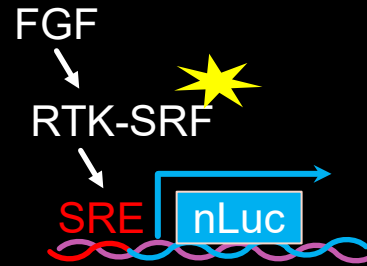


iPSレポーター細胞

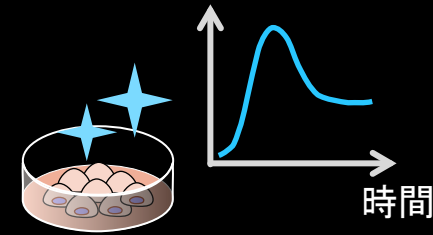
化学物質添加



FGF刺激

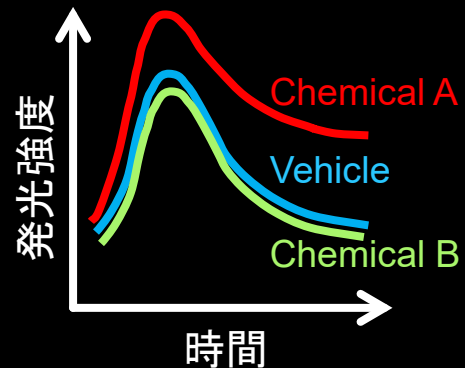


経時的な発光測定

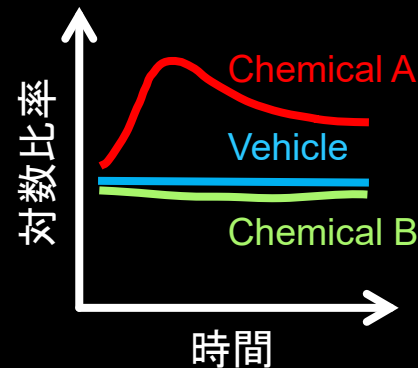


データ解析

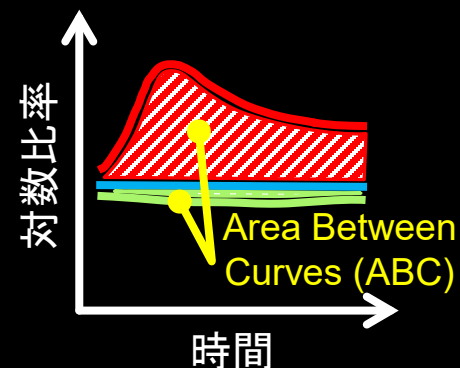
発光強度の
時間変化



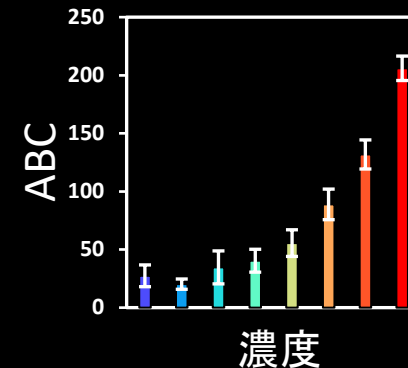
溶媒対照群による
標準化



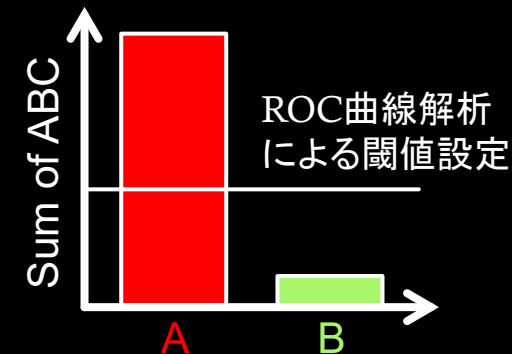
ABC算出



各濃度のABC



シグナル攪乱の指標
(Sum of ABC) 比較



試験物質

ECVAM、ICHに記載の化学物質

発生毒性物質

all-trans-Retinoic Acid (ATRA)

Hydroxyurea

Methotrexate Hydrate

Methoxyacetic Acid (MAA)

Methylmercuric Chloride (MeHg)

Sodium Salicylate

Valproic Acid

5-Fluorouracil (5-FU)

Cyclophosphamide (CPA)

Imatinib

Lenalidomide

Pomalidomide

Thalidomide

非発生毒性物質

Acrylamide

D-Camphor

Dimethyl Phthalate

Diphenhydramine Hydrochloride

Penicillin G Sodium Salt

Sodium Saccharin

Acetaminophen

Amoxicillin

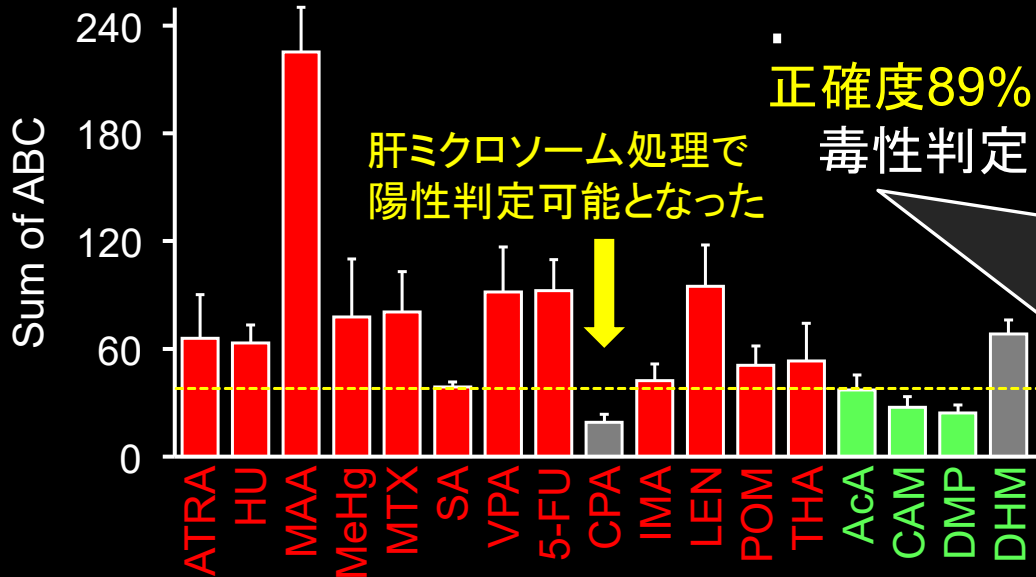
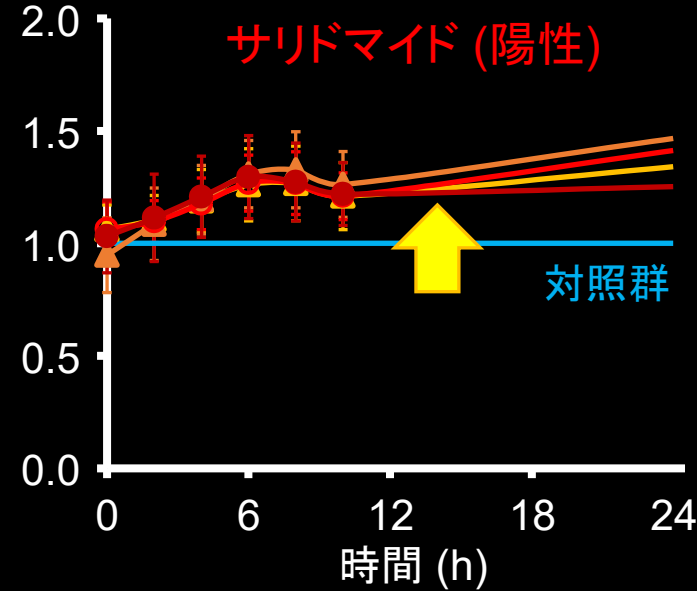
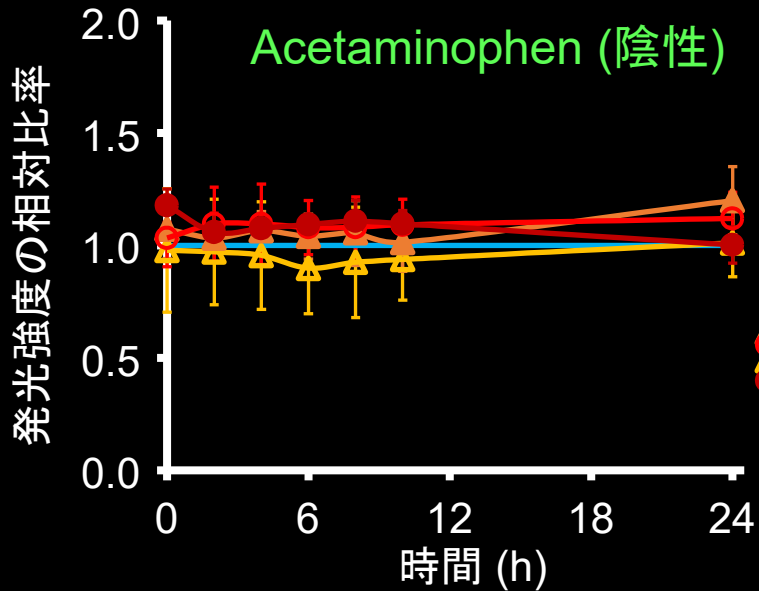
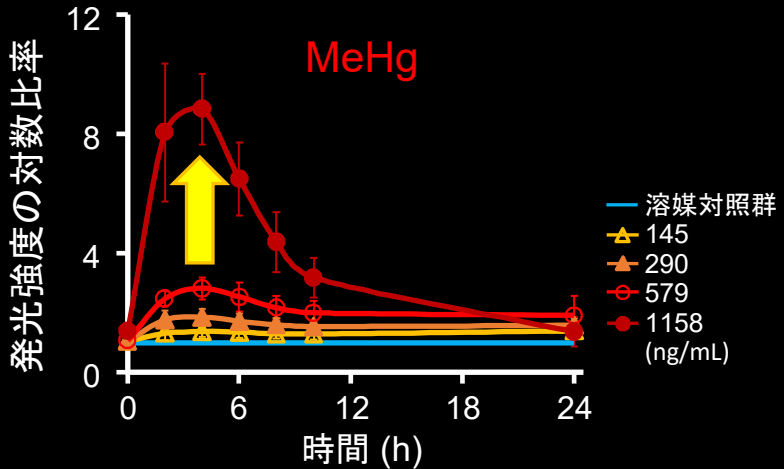
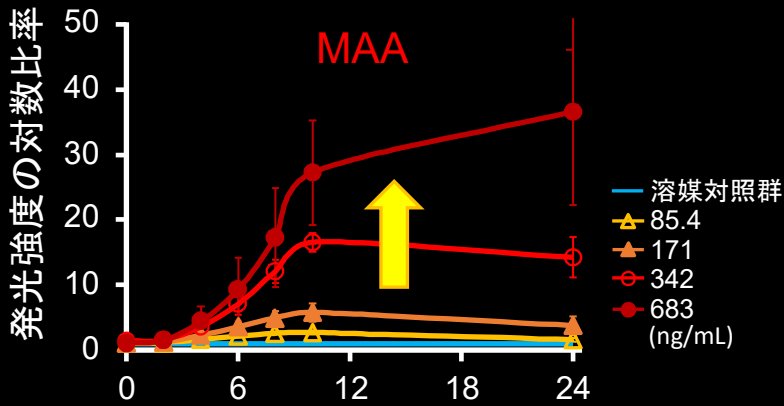
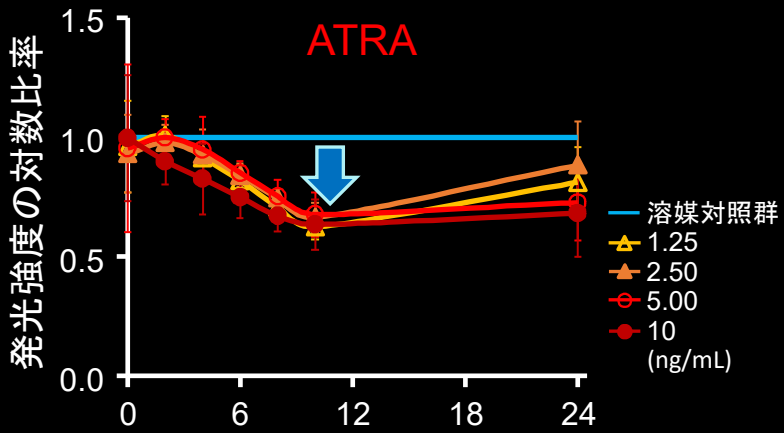
Cimetidine

Erythromycin

Hydrochlorothiazide

Sulfasalazine

FGFシグナルの攪乱



試験法	正確度 (%)
mEST	78-83
Hand1-EST	83
ラット全胚培養	80
ReProGlo	76
ゼブラフィッシュ胚	72
ラットマイクロマス	70
本研究	89

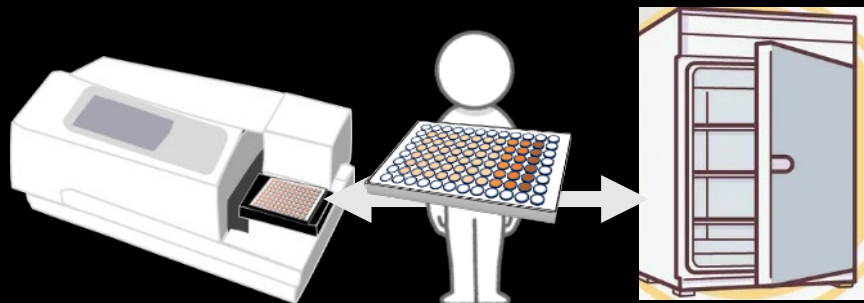
リアルタイム発光測定への導入

産総研
中島先生

手作業による発光計測

発光プレートリーダー

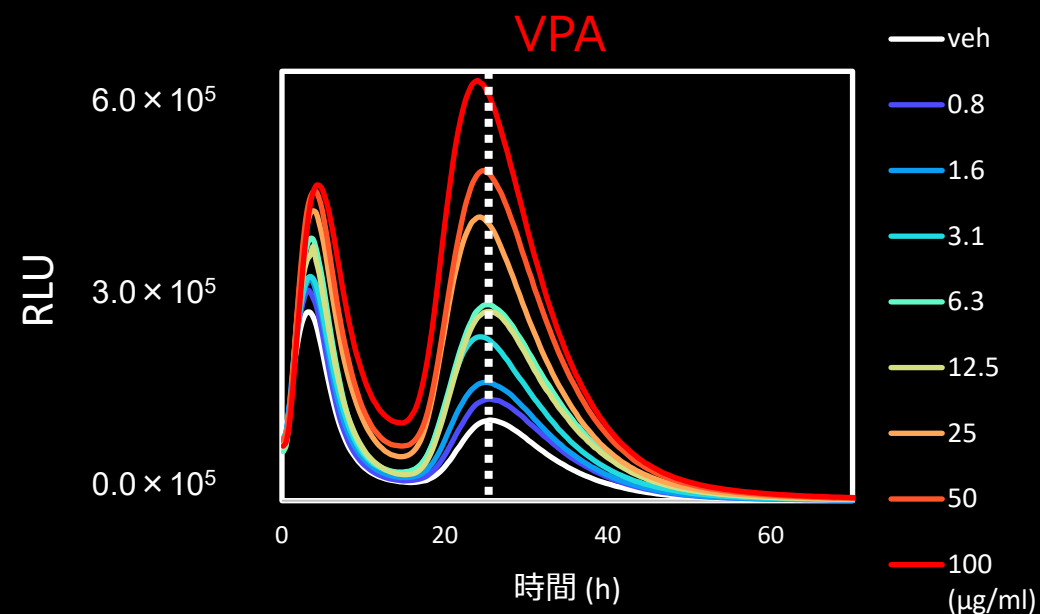
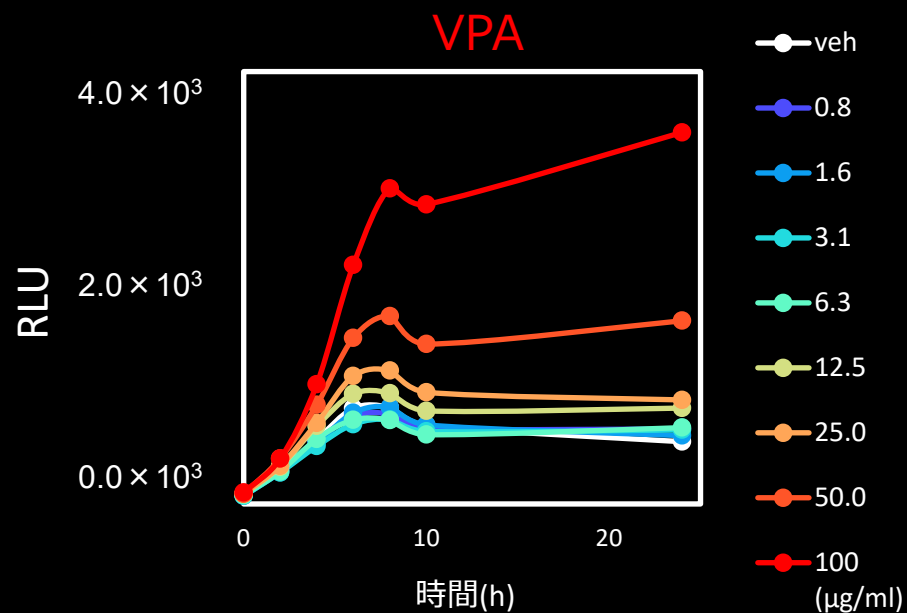
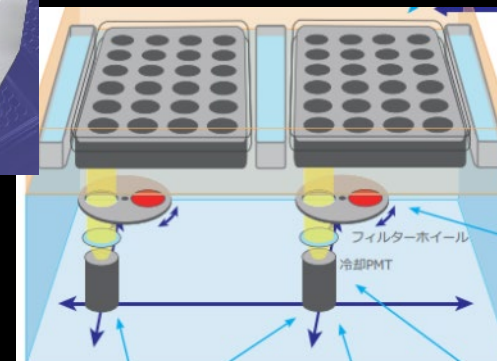
インキュベータ



リアルタイム発光測定装置

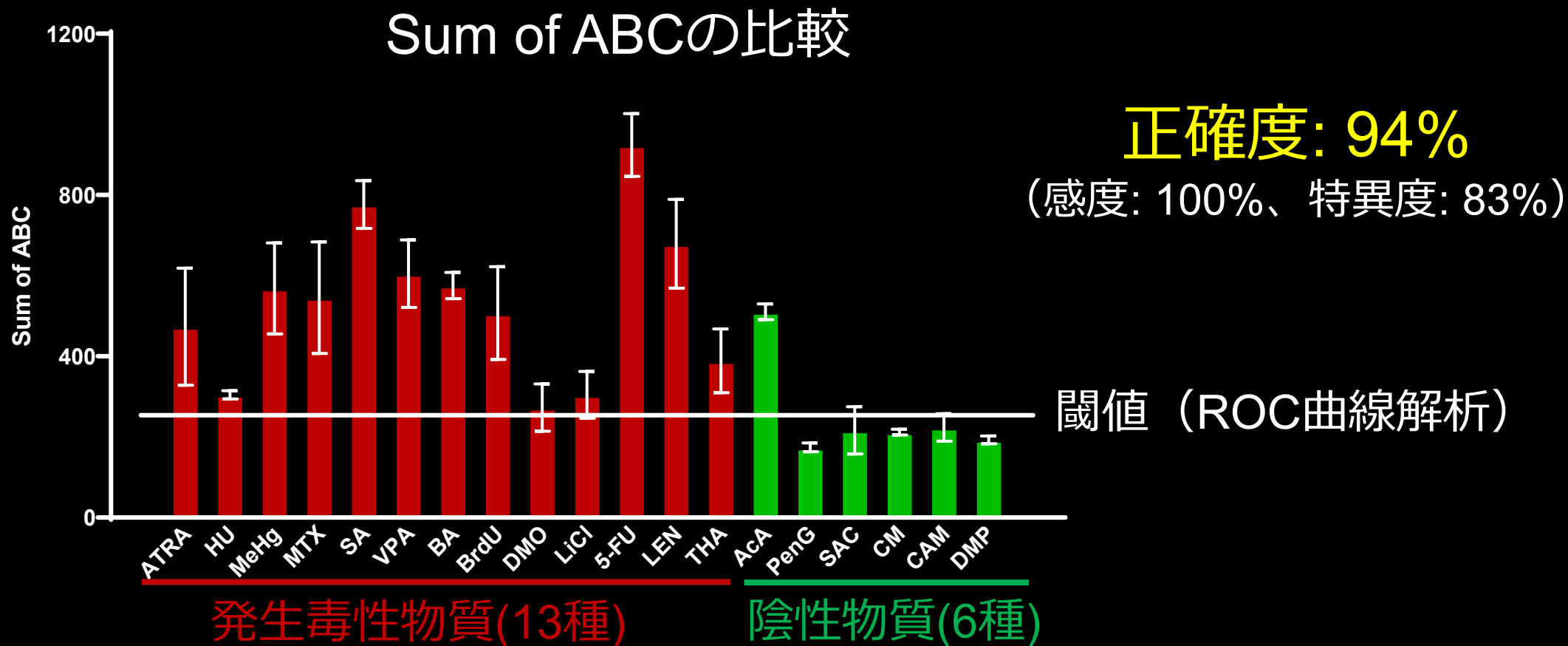


ATTO社 Kronos-HT



リアルタイム測定法による発生毒性物質の評価

溝田、
修士修了2025



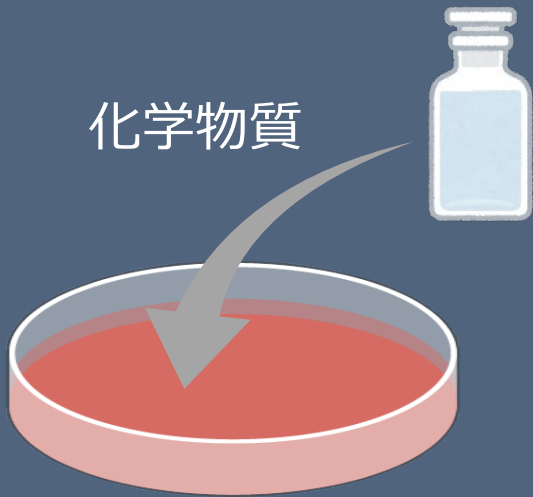
✓ハザード評価 (毒性の有無) として利用できる可能性が示された

ハザード評価 → 血中濃度を考慮したリスク評価へ？

村山、
修士修了2026

各化合物の最大試験濃度の決定方法

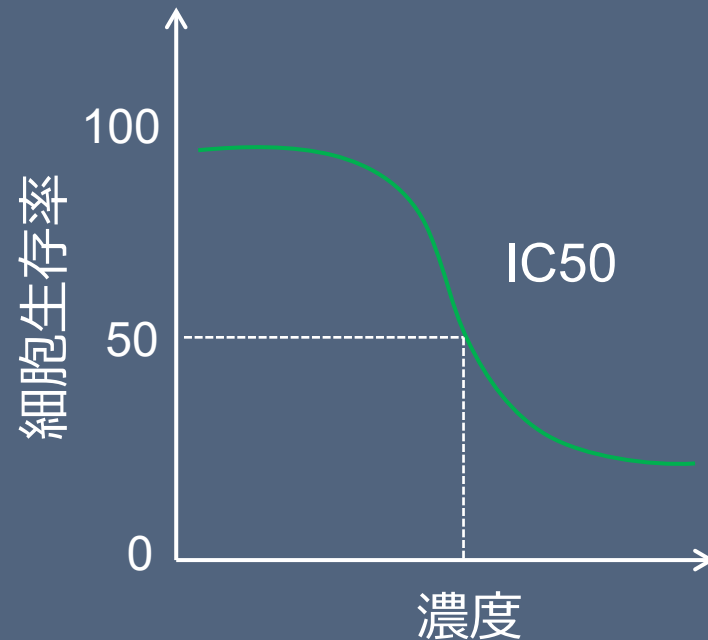
最大溶解度



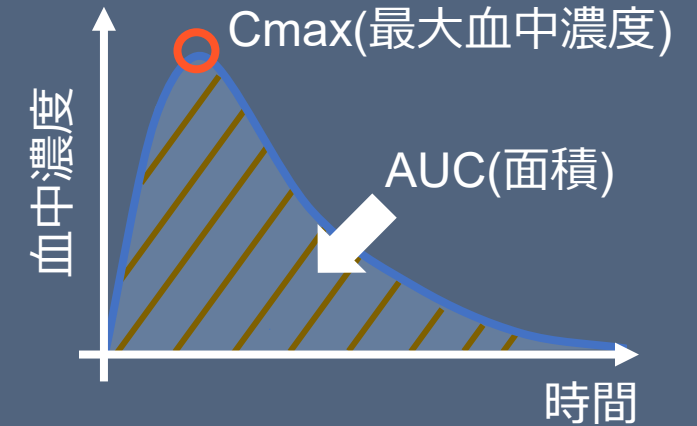
結晶残存の顕微鏡観察

+

50%細胞生存濃度 (IC50)



臨床データ：ヒト暴露量

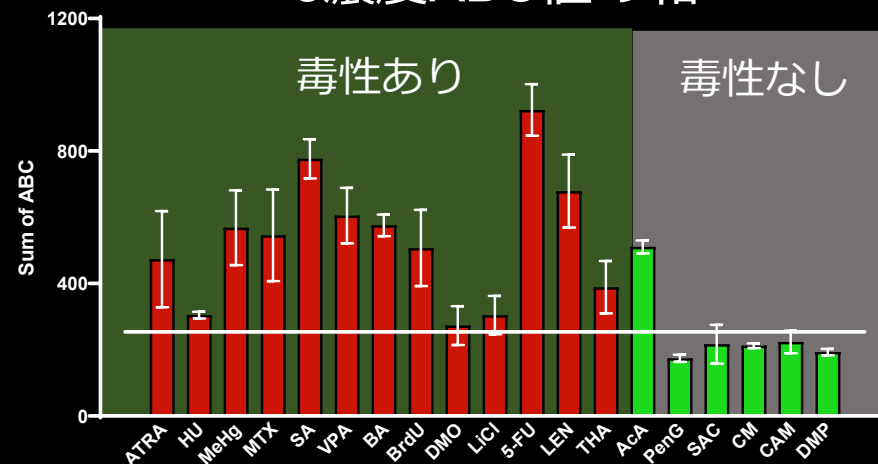


ヒト暴露濃度を考慮しておらず、（特に陰性物質において）
最大血中濃度Cmaxの100-1000倍の濃度となっていた。

ハザード評価 → 血中濃度を考慮したリスク評価へ？

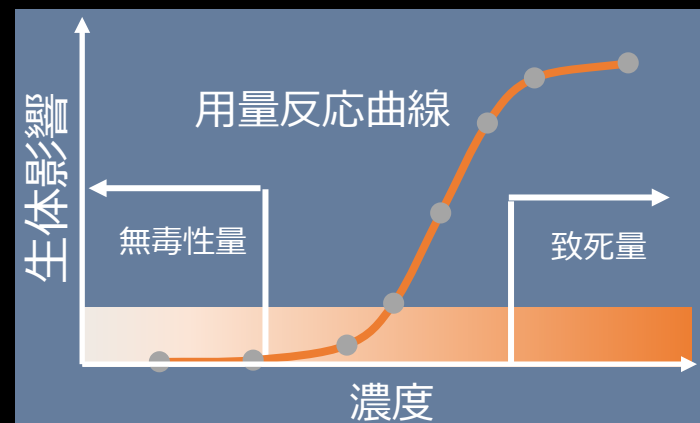
ハザード評価

8濃度ABC値の和

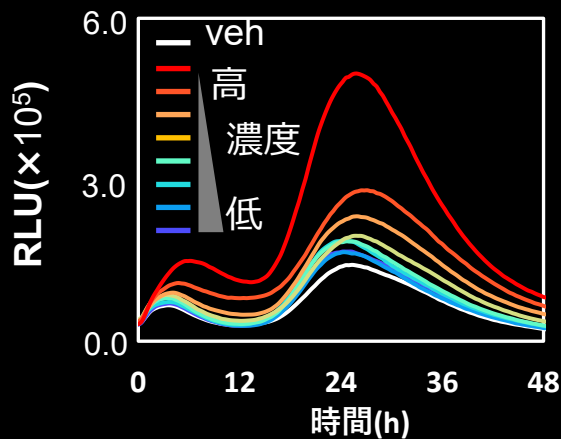


リスク評価

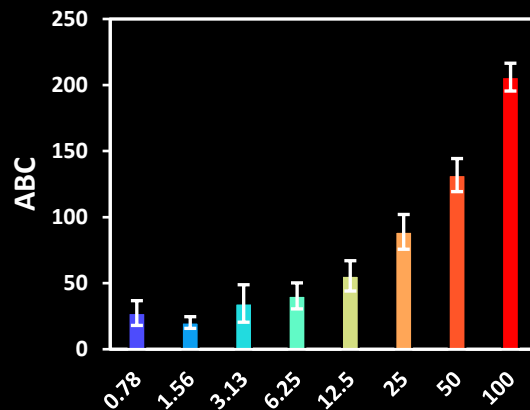
生体内濃度を考慮した判断



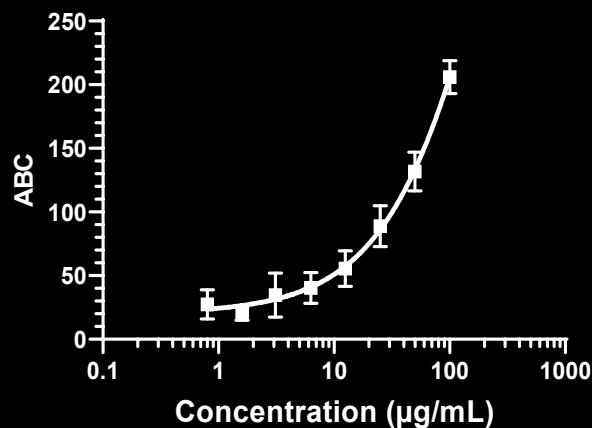
8濃度Rawデータ



8濃度ABC値の算出

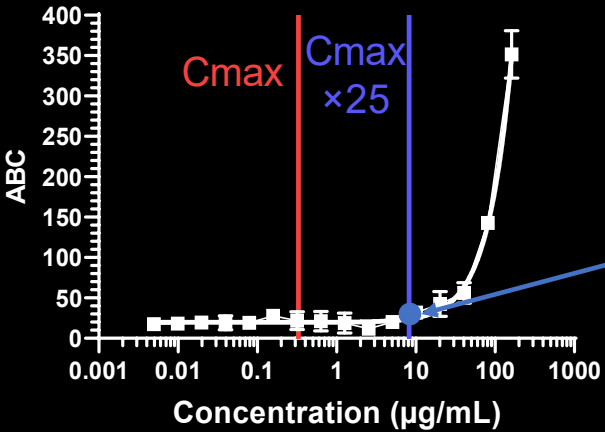


用量反応曲線



非発生毒性物質セットによるカットオフ値の設定

Cetirizine

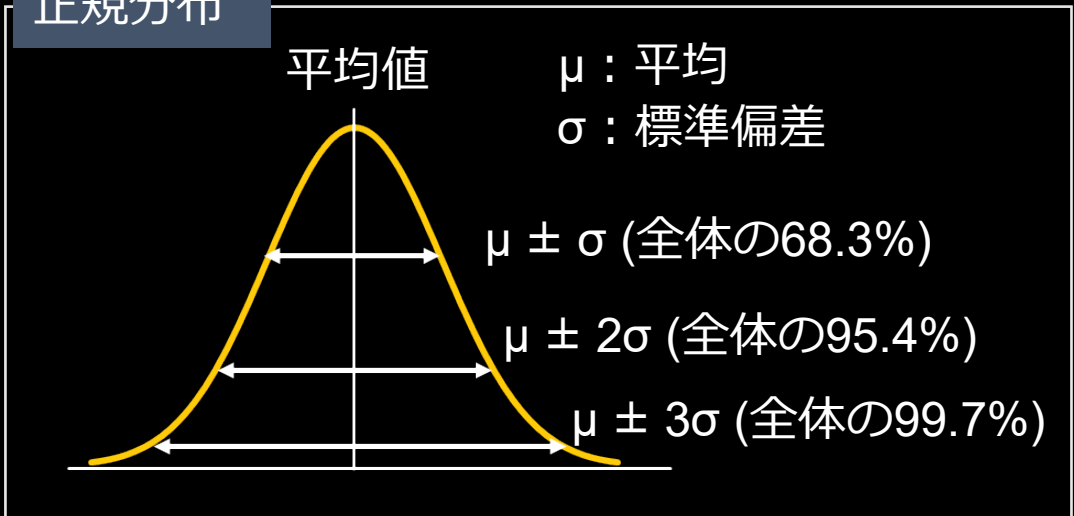


①

C_{max} の25倍濃度のABC値を求めた

	$C_{max} \times 25$ (μg/mL)	ABC値
CTZ	8.3	23.8
SAXA	0.6	23.8
VILD	13.0	32.1
PenG	6.5	21.4
CAM	1.0	32.9
DHM	1.6	30.0
CM	71.8	26.9

正規分布



②

Average	SD	$\mu + 3\sigma$
27.3	4.5	40.76

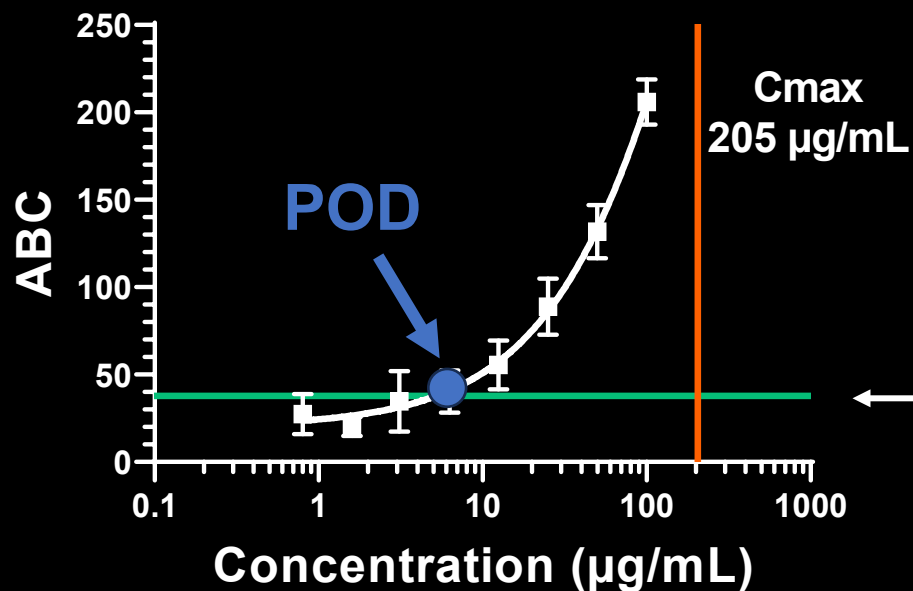
$\mu \pm 3\sigma$ の値を閾値とした。

PODとCmaxに基づくリスク評価

POD (Point of departure) ≡ 有意なシグナルかく乱を生じ始める濃度

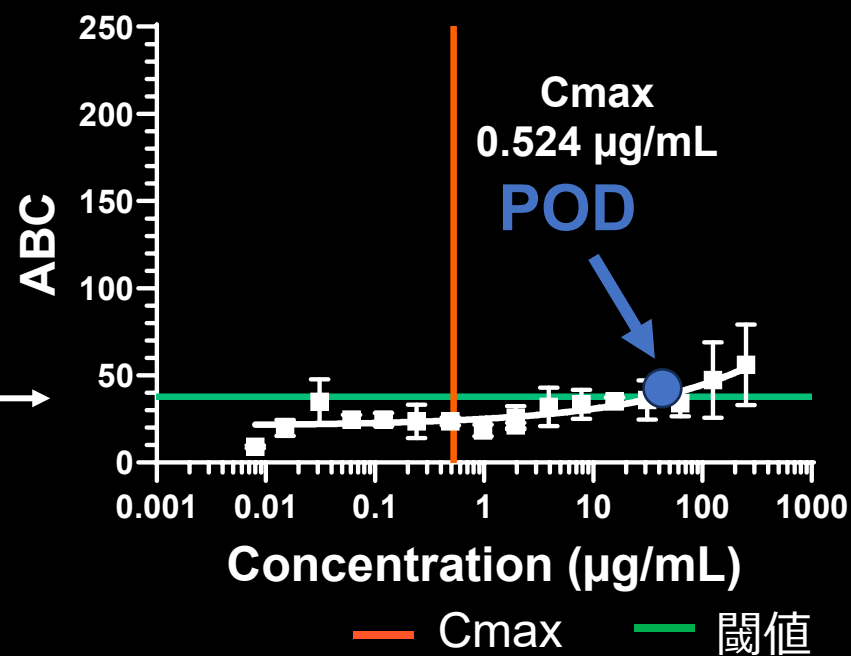
発生毒性物質

Valporic acid



非発生毒性物質

Vildagliptin



POD $\leq$ Cmax ➡ 発生毒性のリスクが高い

POD $>$ Cmax ➡ リスクが低い

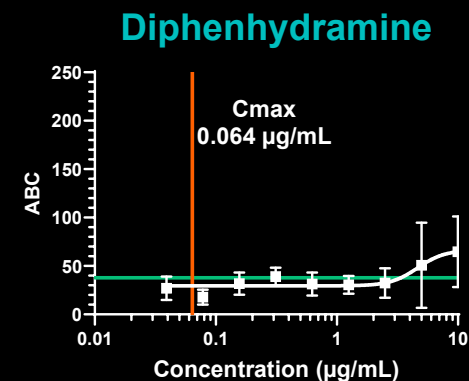
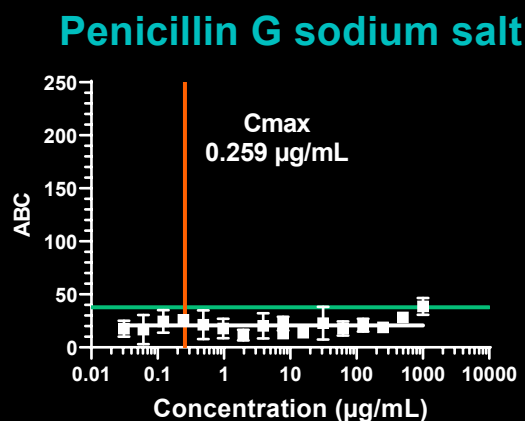
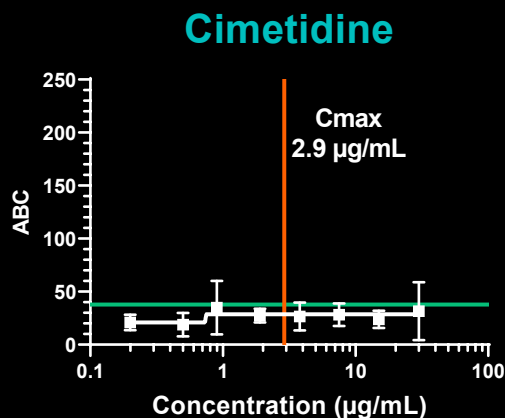
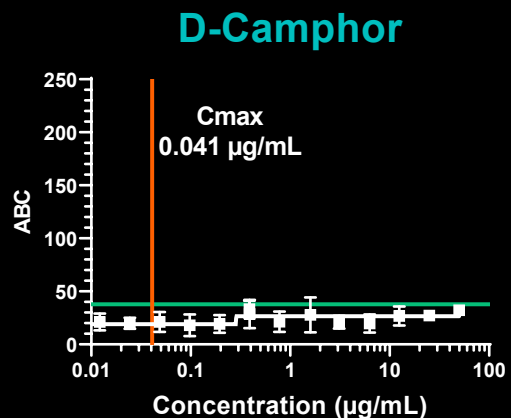
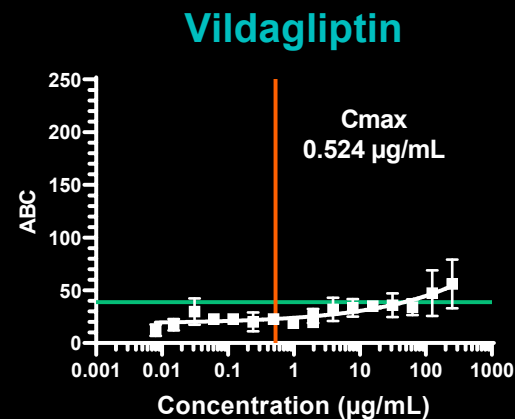
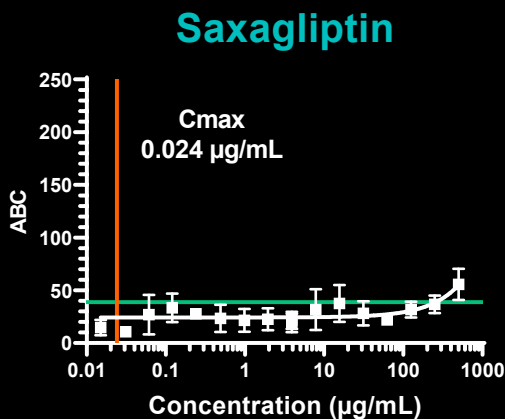
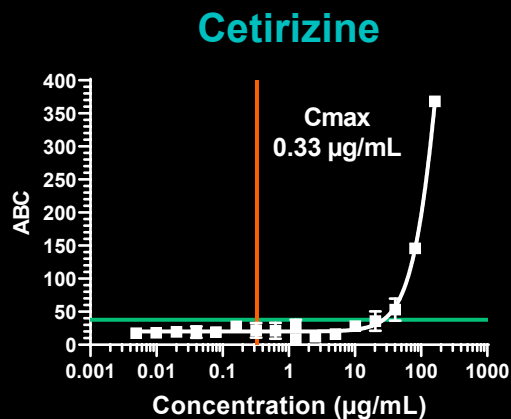
ヒト最大血中濃度(Cmax)の情報

試験物質：試験済みの医薬品12種 + ICHS5の添付文書に記載の陰性物質3種

※ICHS5：医薬品の生殖発生毒性試験の係るガイドライン

試験物質		試験した 最大濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	reference
陽性物質 (9種)	all-trans-Retinoic acid	0.010	0.394	ICHS5 添付文書
	Hydroxyurea	149	52	ICHS5 添付文書
	Methotrexate hydrate	5.00	2.14	ICHS5 添付文書
	Sodium salicylate	666	45.2	ICHS5 添付文書
	Valporic acid	100	205	ICHS5 添付文書
	5,5-Dimethyl-2,4-oxazolidinedione	840	1251	ICHS5 添付文書
	5-Fluorouracil	14.1	29.0	ICHS5 添付文書
	Lenalidomide	35.0	0.72	Interview form (Japan, Sawai Pharmaceutical Co)
	Thalidomide	12.0	0.62	ICHS5 添付文書
陰性物質 (7種)	D-Camphor	50.0	0.041	Martin et al.(2004)
	Penicillin G sodium salt	1000	0.259	Interview form (Japan, Ffizer Co)
	Cimetidine	30.0	2.87	Interview form (Japan, Sawai Pharmaceutical Co)
	Diphenhydramine hydrochloride	262.0	0.064	Luna et al. (1989)
	Saxagliptin	500.0	0.024	ICHS5 添付文書
	Vildagliptin	250	0.52	Interview form (Japan, Sawai Pharmaceutical Co)
	Cetirizine	162.0	0.33	ICHS5 添付文書

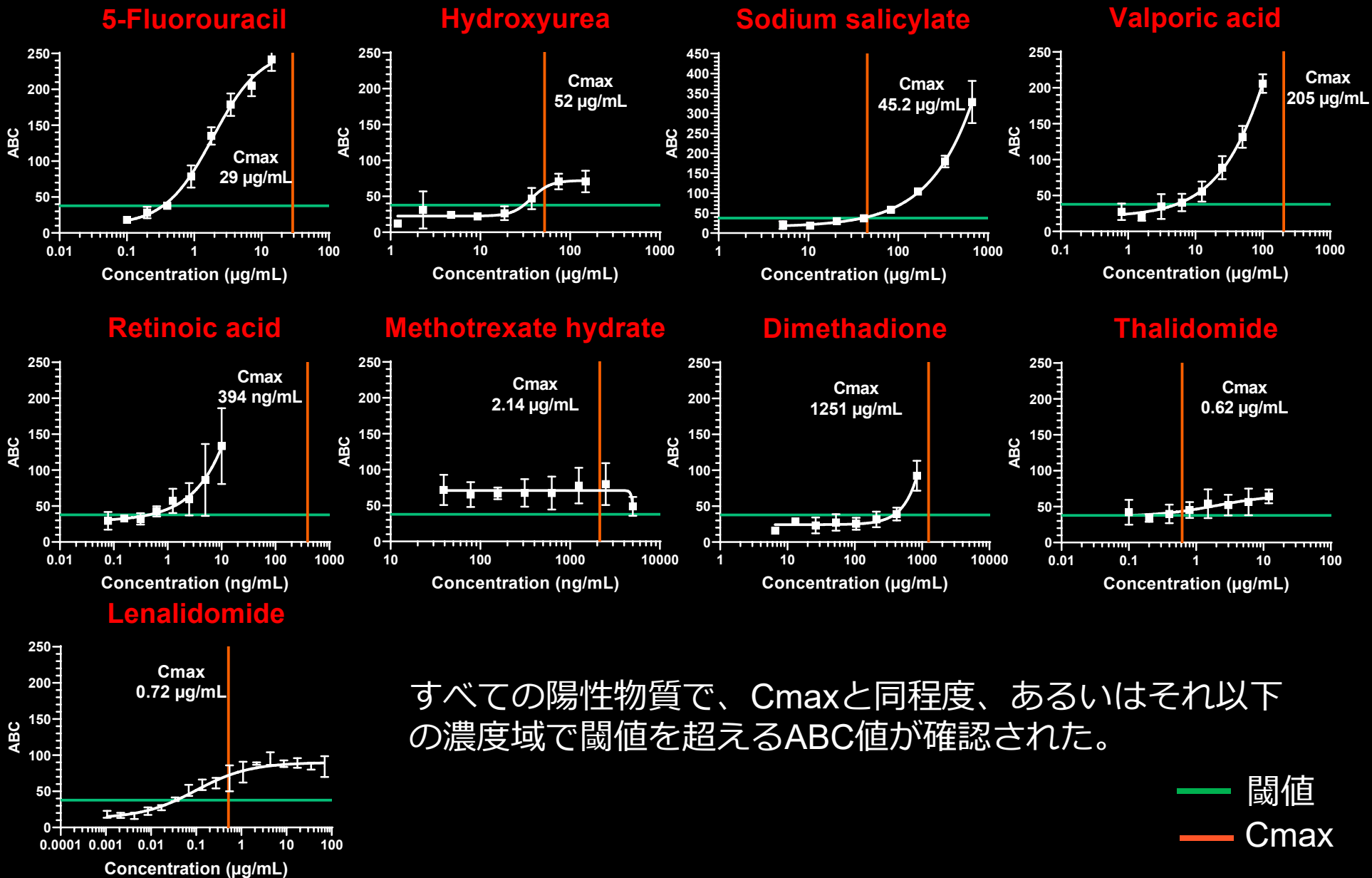
非発生毒性物質における閾値とCmaxの比較



— Cmax — 閾値

すべての陰性物質がCmaxにおける
ABC値が閾値を下回った。

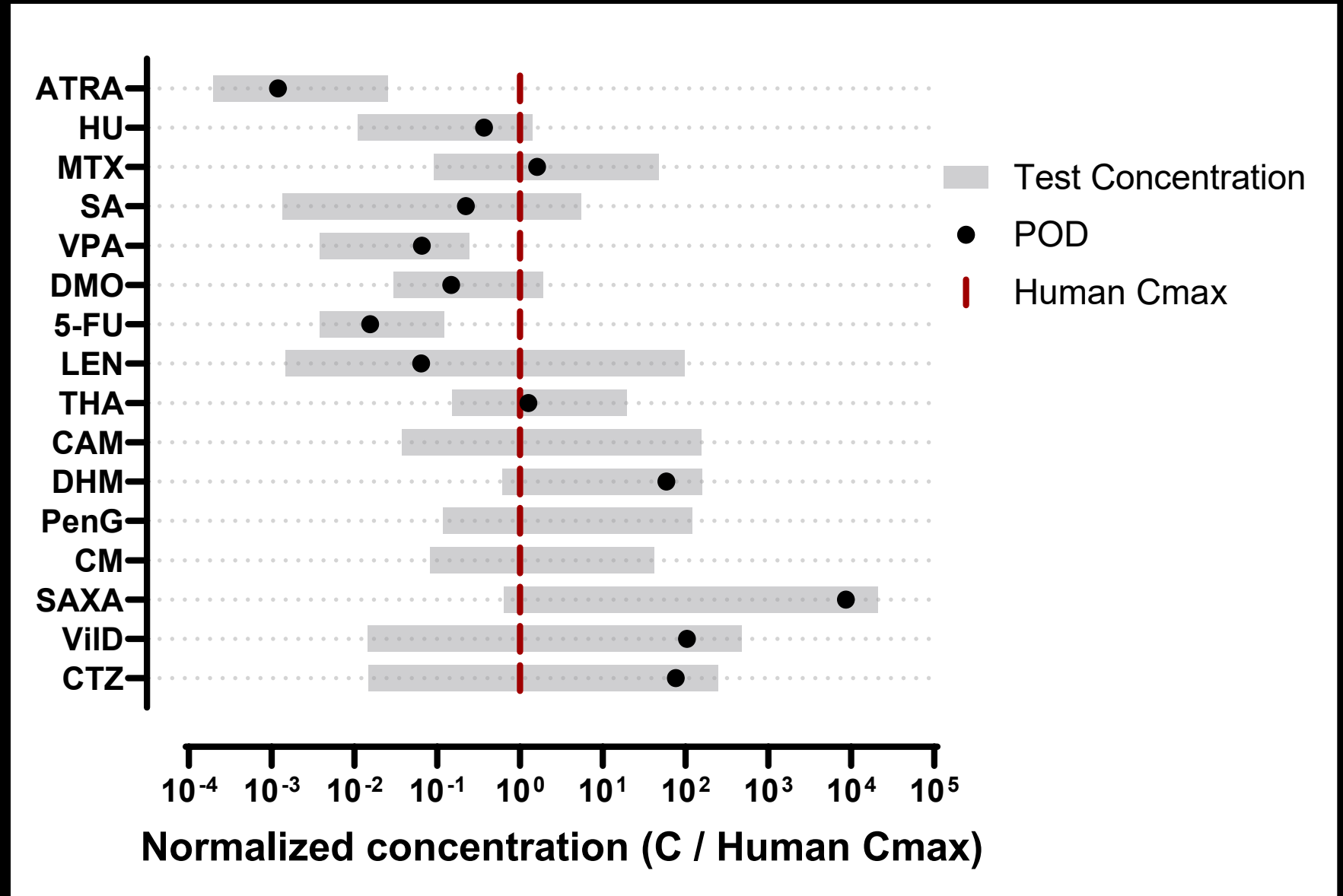
発生毒性物質における閾値とCmaxの比較



CmaxとPOD、試験濃度範囲のまとめ

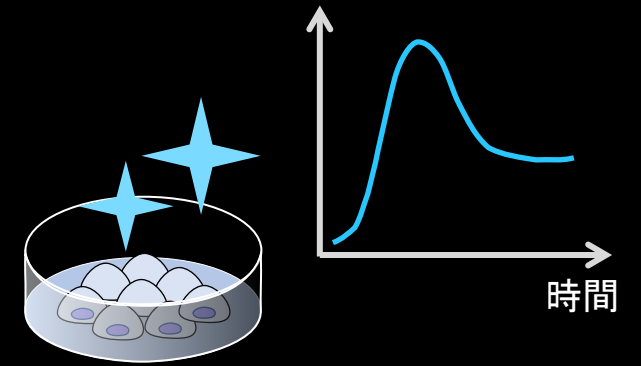
発生毒性物質

非発生毒性物質

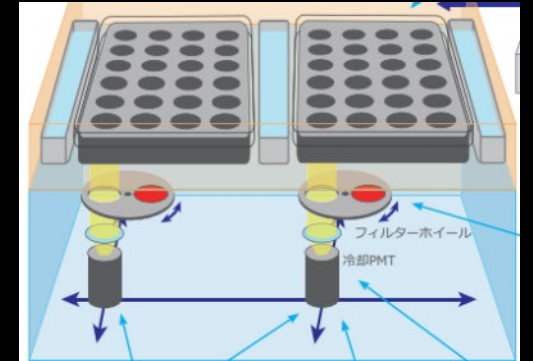


総括

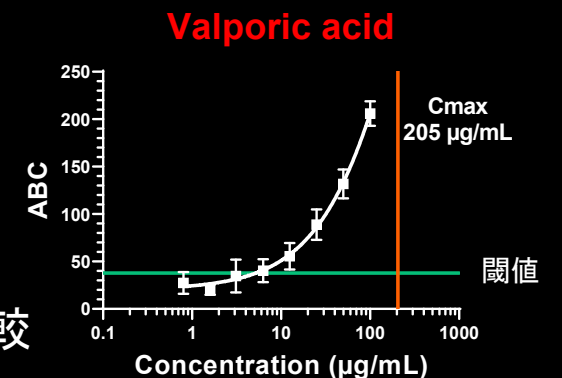
1. 催奇形性という結果ではなく、シグナル攪乱というプロセスに着目した発生毒性試験法を開発した。
2. リアルタイム発光測定を導入により、より時間分解能の高い発光モニタリングと測定者の負荷軽減が可能となった。
3. 最大血中濃度を考慮したリスク評価への展開の可能性を示した。



iPSレポーター細胞



リアルタイム発光計測



Cmaxと閾値の比較

コンソーシアムと技術講習会

第1回技術講習会@殿町 2026/6/15

目的：リスク評価に向けたデータ収集 及び 技術移転に向けた共同研究の提案

厚生労働科学研究費 補助金(化学物質リスク研究事業) 大久保班
「発生毒性リスク評価に資するシグナル伝達かく乱作用を基にした NAMs の開発」

研究代表者・分担者

- | | | |
|---|---------------|------------------------------|
| 1 | <u>大久保 佑亮</u> | 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 第四室長 |
| 2 | 福田 淳二 | 横浜国立大学 先端科学高等研究院 教授 |
| 3 | 栗形 麻樹子 | 帝京平成大学 健康医療スポーツ学部医療スポーツ学科 教授 |
| 4 | <u>中島 芳浩</u> | 産業技術総合研究所 健康医工学研究部門 研究グループ長 |
| 5 | 平林 容子 | 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長 |
| 6 | 小島 肇 | 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 客員研究員 |

参加者：産官学32名 + α

試験物質を15種→60種へと増やし、試験精度の検証を進める。施設間バリデーションを進め、OECDのテストガイドライン化を目指す。

配布中
のSOP