

**研究課題名：香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究**

研究代表者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

**研究要旨**

本研究では、香料化学物質の安全性を *in silico*、*in vitro*、*in vivo* で階層的に評価する評価系を構築し、食品香料の効率的且つ信頼性の高い安全性評価の推進に資することを目的とする。また、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法としての条件設定を行い、多施設で実施可能な標準法の確立を目指す。

I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

変異原性試験未実施の食品香料化合物 3,942 物質について、2 つの QSAR（DEREK Nexus、CASE Ultra）を用いてエームス変異原性の予測を行い、58 化合物で陽性と予測された。10 化合物についてエームス試験を実施した結果、9 化合物が陽性を示した。この結果は香料の変異原性評価に QSAR 手法が十分に利用可能であることを示している。チミジンキナーゼ遺伝子（TK）変異試験の共同研究を開始し、プロトコルの評価と共有化を行った。Ames 試験陽性の非発がん性物質について暫定結果が得られた 4 物質中の 3 物質が TK 変異試験で陽性であった。DNA 初期損傷と遺伝子突然変異の相関を明らかにするため、*gpt delta* マウスを用いたアクリルアミド飲水投与と実験を実施し、DNA 付加体形成量の測定を行った。DNA 付加体量は用量依存的に増加し、組織による明らかな感受性の差は認められなかった。一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験では acetamide を被験物質として、用量設定試験を実施した後、*gpt delta* ラットに 13 週間混餌投与し、一般毒性評価を開始した。遺伝毒性・発がん性中期包括試験では、3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質として、F344 ラットを用いた 7 日間及び 28 日間の用量設定試験を実施し、本試験の実施用量を検討した。

II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究

マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法としての条件設定を行い、多施設で実施可能な標準法の確立を目的として、*gpt delta* マウスを含む各種遺伝子改変マウスなどの正常組織から調製したオルガノイド系に陽性対照として遺伝毒性発がん物質を用いた検討を行った。その結果、発がん性試験法としての条件設定に関しては被験物質によるマウス系統差があることが示され、遺伝毒性試験法については解析を継続することとした。また、調整済みのオルガノイドは常温輸送にて多施設間で共有可能であり、標準操作手順書に従った継代・培養・被験物質処置に関する技術が短期間で習得できることが確認できた。

## 研究分担者

安井 学	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
増村健一	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
石井雄二	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長
高須伸二	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官
小川久美子	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長
西川秋佳	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 客員研究員
今井俊夫	国立がん研究センター・研究所 動物実験部門長
落合雅子	国立がん研究センター・研究所 動物実験部門 外来研究員
戸塚ゆ加里	国立がん研究センター・研究所 発がん・予防研究分野 ユニット長
三好規之	静岡県立大学 食品栄養科学部 准教授
筆宝義隆	千葉県がんセンター・研究所 発がん制御研究部長
平田暁大	岐阜大学 研究推進・社会連携機構 助教

## A . 研究目的

本研究では、香料化学物質の安全性を *in silico*、*in vitro*、*in vivo* で階層的に評価する評価系を構築し、食品香料の効率的且つ信頼性の高い安全性評価の推進に資することを目的とする。QSAR (*in silico*)、Ames 試験、TK6 試験 (*in vitro*)、一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法 (*in vivo*) を階層的に組み合わせることにより、遺伝毒性及び発がん性を包括的評価することが可能なだけでなく、各階層の結果から発がんに対する遺伝毒性の寄与や、そのメカニズムを解析する。遺伝毒性が疑われる

香料については *in vivo* 試験 (一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験) や肝臓または腎臓を標的とする遺伝毒性・発がん性中期包括試験による評価を行う。また、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法としての条件設定を行い、多施設で実施可能な標準法の確立を目指す。更に、従来動物モデルでは腫瘍性病変が発生しづらい胃由来のオルガノイドに対する化学物質の反応性解析法の確立を目的とし技術基盤を構築する。

本研究班は上記の目的を達成するため、以下の研究に取り組んだ。

### 1. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

#### 1) QSAR と Ames 試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究 (本間):

食品香料は、一般に数十から数百種類混合して用いられることが多いが、個々の香料の食品への添加量は数 ppt から数 ppm レベルで有り、過剰摂取は考えられないことから、一般毒性の懸念は少なく、問題となる毒性は変異原性である。一方、変異原性の評価のためのエームス試験には数グラム程度の試験サンプルが必要であるため QSAR の適用が望まれるが、その精度が問題となる。本研究では QSAR で変異原性が予測された化合物について、実際にエームス試験を実施し、QSAR 結果を検証することを目的とする。

#### 2) Ames 試験陽性のフォローアップに関するチミジンキナーゼ遺伝子変異試験の共同研究組織の構築および実験プロトコール評価 (安井):

Ames 試験陽性の結果は、医薬品等の開発に大きな影響を与え、適切なフォローアップが必要となるが、*in vivo* トランスジェニック試験は負担が大きいと考えられる。その陽性反応がバクテリア特異的反応である場合、ヒトへの外挿性が低いことを証明し、無駄な *in vivo* 試験を避けることができる可能性がある。Ames 試験陽性の非発がん性物質を、ほ乳類細胞を用いた遺伝毒性試験 (チミジンキナーゼ遺伝子(TK)

変異試験)でフォローアップし、ほ乳類細胞でも同様に変異原性を示すかどうかを検証することを目的とする。

### 3) AOP と定量的評価を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化 (増村):

OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法 (AOP)」を取り入れた遺伝毒性評価系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指すとともに、遺伝毒性の定量的な評価に取り組む。分子的初期イベントである DNA 初期損傷 (DNA 付加体形成) と、続くキーイベントである遺伝子突然変異誘発に関して、*in vivo* における量的相関を明らかにすることを目的とする。

### 4) Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法による評価 (石井、高須、西川、小川):

香料の迅速かつ包括的な安全性評価のため、これまでに構築したレポーター遺伝子導入動物を用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験との有用性を検討する。過去に食品香料として用いられていたアセタミドについて一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験による評価を実施する。

### 5) 肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価 (高須、石井、西川、小川):

肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験 (GPG 又は GNP モデル) の有用性を検討する。In silico 解析結果から遺伝毒性が疑われる 3-acetyl-2,5-dimethylfuran について肝遺伝毒性・発がん性中期包括試験による評価を実施する。

## II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究 (今井、落合、戸塚、三好、筆宝、平田)

我々はこれまでに、レポーター遺伝子導入マウスから 3 次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質の

検出が可能で、がん関連遺伝子改変マウスの正常組織から調製したオルガノイド系につき、既知の発がん物質が造腫瘍性あるいは上皮細胞の重層化 / 異型性 / 浸潤性を指標とする腫瘍化を示す変化を誘導することを見出した。本研究では、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法としての条件設定を行い、多施設で実施可能な標準法の確立を目指す。更に、従来の動物モデルでは腫瘍性病変が発生しづらい胃由来のオルガノイドに対する化学物質の反応性解析法の確立を目的とし技術基盤を構築する。

## **B. 研究方法**

### 1. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

#### 1) QSAR と Ames 試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究 (本間):

DEREK Nexus、CASE Ultra の 2 つの QSAR モデルを用いて、食品香料化合物データベース 2015 の収載の 3,942 物質の変異原性を予測した。変異原性が疑われた化合物については実際にエームス試験を実施した。

#### 2) Ames 試験陽性のフォローアップに関するチミジンキナーゼ遺伝子変異試験の共同研究組織の構築および実験プロトコール評価 (安井):

データベースから抽出された Ames 試験陽性の非発がん性 10 物質について TK 変異試験を実施するために、日本環境変異原学会の分科会である MMS 研究会で共同研究組織を立ち上げ、その TK 変異試験のプロトコールの評価と共有化を行った。

#### 3) AOP と定量的評価を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化 (増村):

雄 *gpt delta* マウスを用いてアクリルアミド (AA) を 28 日間飲水投与し、最終投与 3 日目に組織 (肝臓、肺、精巣) を採取した。組織からゲノム DNA を調製して脱塩基処理を行い、LC-MS/MS を用いて DNA 付加体 (N7-GA-Gua) を測定した。

#### 4) Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法による評価 (石井、高須、西川、小川):

用量設定試験として F344 ラットにアセタミドを 1.25、2.5 及び 5.0% の濃度で 28 日間混餌投与し、血清生化学検査及び病理組織学的検索を実施した。本試験では F344 系 *gpt delta* ラットにアセタミドを 0.6、1.25 及び 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与し、一般毒性評価を実施した。

#### 5) 肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価 (高須、石井、西川、小川):

用量設定試験として F344 ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 125、250、500 又は 1000 mg/kg/day の濃度で 7 日間強制経口投与した。更に、60、180 又は 540 mg/kg の濃度で 28 日間強制経口投与し、本試験の用量を検討した。

#### II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究 (今井、落合、戸塚、三好、筆宝、平田)

*gpt delta* マウス、C57BL / BALB/c 背景の *Trp53*<sup>+/-</sup> マウス、LSL-*Kras*<sup>G12D</sup> マウスの肺と肝臓からオルガノイドを調製した。発がん性試験法としての条件設定のため、陽性対照としてメタンスルホン酸エチル (EMS)、アクリルアミド (AA)、ジエチルニトロソアミン (DEN)、7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン (DMBA)、陰性対照として安息香酸ナトリウム (SB) を用いて検討した。オルガノイドの調製と化学物質処置方法についての標準操作手順書を作成し、樹立したオルガノイドとともに分担研究者間で共有した。胃については、*Trp53* 欠失と *Cdh1* ノックダウンの影響を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、各研究施設の規定に従って動物実験倫理委員会の承認を得た後に実施し、実験動物に対する動物愛護に関して十分配

慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 (平成 15 年法律第 97 号) 等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認を得た後に実施した。

### C. 研究結果

#### I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

##### 1) QSAR と Ames 試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究 (本間):

3,942 物質のうち 58 化合物が 2 つの QSAR モデルで陽性と予測され、変異原性が疑われた。このうちエームス試験データのない 10 化合物に関しては実際にエームス試験を行ったところ、9 化合物で陽性を示した。

##### 2) Ames 試験陽性のフォローアップに関するチミジンキナーゼ遺伝子変異試験の共同研究組織の構築および実験プロトコール評価 (安井):

非発がん性だが Ames 試験陽性を示す 10 物質について、TK 変異試験でフォローアップをする共同研究組織を構築した。製薬会社、総合化学メーカー、および CRO 会社など 10 社の参加が決定した。TK 変異試験の実験プロトコールは、OECD ガイドライン TG490 (チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験) に基づくが、より実験施設間のデータばらつきを最小にするために、実験条件や操作方法を確認・評価し、共同研究組織内で現実的に利用できる実験プロトコールを共有化した。

##### 3) AOP と定量的評価を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化 (増村):

AA の 28 日間飲水投与と実験を行った。最高用量 300 ppm 群では体重増加抑制が認められた。組織サンプルから DNA を抽出し、脱塩基処理を行って N7-GA-Gua 付加体形成量を測定した。肝臓、肺、精巣において AA 用量依存的な N7-GA-Gua 付加体量の増加がみられた。用量

反応関係はほぼ直線的であり、組織による顕著な差は認められなかった。AA 1 mg/kg/day あたりの付加体形成量は 60~75 個/10<sup>8</sup> 塩基であった。

#### 4) Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法による評価 (石井、高須、西川、小川):

アセタミドの用量設定試験において、2.5%群から肝毒性パラメーターの増加と肝細胞のアポトーシスや細胞内封入体、核分裂像等が認められ、5.0%群では一般状態の悪化が認められた。本試験では 1.25%から肝重量の低下、肝毒性パラメーターの増加がみられた。

#### 5) 肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価 (高須、石井、西川、小川):

3-Acetyl-2,5-dimethylfuran の肝遺伝毒性・発がん性中期包括試験では、7 日間の反復投与により 1000 mg/kg/day 群において体重の低値が認められた。28 日間の反復投与により 180 mg/kg/day 群から肝臓の、540 mg/kg/day 群において腎臓、肺及び脾臓の相対重量が有意に増加した。

### II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究 (今井、落合、戸塚、三好、筆宝、平田)

EMS あるいは AA 処置した肺オルガノイドをヌードマウス皮下に接種したところ、上皮細胞の重層化 / 浸潤性 / 異型性がみられ、DMBA は BALB/c 背景の *Trp53* +/- マウス由来乳腺オルガノイドに造腫瘍性を示すなど、一定の系統差を示しつつ遺伝毒性発がん物質は正常組織由来オルガノイドに発がん性を示す変化を誘発し、SB は変化を示さなかった。*gpt delta* マウスを用いる解析では AA 処置により肺オルガノイドが形態変化を示した。また、各オルガノイドは常温輸送、到着後速やかに培地を再添加することで継続して培養できることを確認した。胃オルガノイドは複数の遺伝子異常で発がん性を示した。

## D. 考 察

### 1. 標準的安全性評価法の確立に関する研究 (本間、安井、増村、石井、高須、西川、小川)

QSAR モデルにより 90%の精度で変異原性物質を同定できることからエーム試験法の代替法として十分に可能性があることが示された。今後は香料に特化したローカル QSAR モデルを開発し、より高い精度を目指す。

TK 変異試験の詳細な実験条件や操作方法を共同研究組織内で評価し、実験プロトコルを共有化することによって、安定したデータが得られた。10 物質中 4 物質の暫定結果が得られ、その 4 物質中の 3 物質が陽性であった。それは Ames 試験結果と一致率が高く、発がん性試験の結果とは一致しなかった。暫定的ではあるが、TK 変異試験が Ames 試験陽性のフォローアップ試験として十分かは不確実である。

AA 投与マウスの肝臓、肺、精巣における N7-dG-GA 付加体形成量に顕著な差はなく、組織が AA 代謝物に全身的に曝露されていることが示された。N7-dG-GA 付加体は水中で脱塩基して DNA から除かれ AP site を生じるため、付加体の寿命は遺伝子突然変異誘発に影響する要因と考えられる。今後は *gpt* 遺伝子突然変異の用量反応データの取得と比較を行う。

一般毒性に関しては、acetamide の本試験において 1.25%から肝毒性パラメーターの上昇と、その他の血清生化学ならびに血液学的パラメーターの変化も認められた。これらの毒性学的意義については次年度に実施する病理組織学的検査の結果とともに考察する。また、肝臓の変異原性を検討することで、その発がん機序についても有用な知見が得られると考えられる。3-acetyl-2,5-dimethylfuran については、180 及び 540 mg/kg 群で認められた肝及び腎相対重量の増加は投与に起因した変化と考えられた。今後、血清生化学的検査及び病理組織学的検査を実施することで、毒性影響とその標的臓器を明らかにし、本試験の実施用量を決定する。

## II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究(今井、落合、戸塚、三好、筆宝、平田)

マウスオルガノイド系を用いる発がん性試験法としての条件設定に関して、被験物質によるマウス系統差があることが示され、幅広い被験物質に感受性を示すマウス系統をみつける必要がある。*gpt delta* マウス由来のオルガノイドを用いる遺伝毒性試験法については解析を継続する。また、調製済みのオルガノイドは常温輸送にて他施設間で共有可能であり、標準操作手順書に従った継代・培養・被験物質処置に関する技術が短期間で習得できることが確認できた。来年度は引続き、従来の動物モデルでは検出が難しいとされる胃発がん物質などを含めて遺伝毒性・発がん性が検出可能な短中期試験法としての検討を継続する。

## E. 結論

### 1. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

変異原性試験未実施の食品香料化合物 3,942 物質について、2 つの QSAR (DEREK Nexus、CASE Ultra) を用いてエームス変異原性の予測を行ったところ、58 化合物で陽性と予測された。この内 10 化合物について実際のエームス試験を実施したところ、9 化合物が陽性を示した。この結果は香料の変異原性評価に QSAR 手法が十分に利用可能であることを示している。

Ames 試験陽性の非発がん性 10 物質について TK 変異試験でフォローアップするために共同研究組織を立ち上げ、プロトコルの評価と共有化を行った。10 物質中 4 物質の暫定結果が得られ、4 物質中の 3 物質が陽性であった。

DNA 初期損傷および遺伝子突然変異の用量反応データを取得するため、*gpt delta* マウスを用いた AA 飲水投与実験を実施し、組織における DNA 付加体形成量を測定した。

一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験ではアセタミドを被験物質として、用量設定試験を実施した後、*gpt delta* ラットに 13 週間混餌投

与し、一般毒性評価を開始した。

遺伝毒性・発がん性中期包括試験では、3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質として、F344 ラットを用いた 7 日間及び 28 日間の用量設定試験を実施し、本試験の実施用量を検討した。

## II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究

マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法としての条件設定を行い、多施設で実施可能な標準法の確立を目的として、*gpt delta* マウスを含む各種遺伝子改変マウスなどの正常組織から調製したオルガノイド系に陽性対照としての遺伝毒性発がん物質を用いた検討を行った。その結果、発がん性試験法としての条件設定に関しては被験物質によるマウス系統差があることが示され、遺伝毒性試験法については解析を継続することとした。また、調整済みのオルガノイドは常温輸送にて多施設間で共有可能であり、標準操作手順書に従った継代・培養・被験物質処置に関する技術が短期間で習得できることが確認できた。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 誌上発表

1. Gadaleta D, Porta N, Vrontaki E, Manganelli S, Manganaro A, Sello G, Honma M, Benfenati E. Integrating computational methods to predict mutagenicity of aromatic azo compounds. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2017, 35(4):239-257. doi: 10.1080/10590501.2017.1391521.
2. Amberg A, Andaya RV, Anger LT, Barber C, Beilke L, Bercu J, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cross KP, Custer L, Dobo K,

- Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Gomez, S, Van Gompel J, Harvey J, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kemper R, Kenyon M, Kruhlak N, Leavitt P, Miller S, Muster W, Naven R, Nicolette J, Parenty A, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Sasaki JC, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, Weiner S, Welch DS, White A, Wichard J, Woolley D, Myatt GJ. Principles and procedures for handling out-of-domain and indeterminate results as part of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018, S0273-2300(18)30314-3. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.12.007.
3. Myatt GJ, Ahlberg E, Akahori Y, Allen D, Amberg A, Anger LT, Aptula A, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Burden N, Cammerer Z, Cronin MTD, Cross KP, Custer L, Dettwiler M, Dobo K, Ford KA, Fortin MC, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gervais V, Glover KP, Glowienke S, Van Gompel J, Gutsell S, Hardy B, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Hughes K, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kim MT, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Majer B, Masten S, Miller S, Moser J, Mumtaz M, Muster W, Neilson L, Oprea TI, Patlewicz G, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Ruiz P, Schilter B, Serafimova R, Simpson W, Stavitskaya L, Stidl R, Suarez-Rodriguez D, Szabo DT, Teasdale A, Trejo-Martin A, Valentin JP, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Hasselgren C. In silico toxicology protocols. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018, 96:1-17. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.04.014.
  4. Mishima M, Hashizume T, Haranosono Y, Nagato Y, Takeshita K, Fukuchi J, and Honma M. Meeting report, ICH M7 relevant workshop: use of (Q)SAR systems and expert judgment. *Genes and Environment (2018)* 40:19. doi.org/10.1186/s41021-018-0107-2
  5. Benfenati E, Golbamaki A, Raitano G, Roncaglioni A, Manganelli S, Lemke F, Norinder U, Lo Piparo E, Honma M, Manganaro A, Gini G. A large comparison of integrated SAR/QSAR models of the Ames test for mutagenicity(S). *SAR QSAR Environ Res.* 2018, 29(8):591-611. doi: 10.1080/1062936X.2018.1497702.
  6. Honma M, Kitazawa A, Cayley A, Williams RV, Barber C, Hanser T, Saiakhov R, Chakravarti S, Myatt GJ, Cross KP, Benfenati E, Raitano G, Mekenyan O, Petkov P, Bossa C, Benigni R, Battistelli CL, Giuliani A, Tcheremenskaia O, DeMeo C, Norinder U, Koga H, Jose C, Jeliaskova N, Kochev N, Paskaleva V, Yang C, Daga PR, Clark RD, Rathman J. Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity: outcomes of the Ames/QSAR International Challenge Project. *Mutagenesis.* 2019, 34(1):3-16. doi:10.1093/mutage/gey031.
  7. Fukuchi J, Kitazawa A, Hirabayashi K, Honma M. A practice of expert review by read-across using QSAR Toolbox.

- Mutagenesis. 2019 Mar 6;34(1):49-54. doi:10.1093/mutage/gy046.
8. Petkov PI, Schultz TW, Honma M, Yamada T, Kaloyanova E, Mekenyan OG. Validation of the performance of TIMES genotoxicity models with EFSA pesticide data. *Mutagenesis*. 2019, 34(1):83-90. doi: 10.1093/mutage/gy035.
  9. Tennant RE, Guesné SJ, Canipa S, Cayley A, Drewe WC, Honma M, Masumura K, Morita T, Stalford SA, Williams RV. Extrapolation of in vitro structural alerts for mutagenicity to the in vivo endpoint. *Mutagenesis*. 2019, 34(1):111-121. doi: 10.1093/mutage/gy030.
  10. Morita T, Shigeta Y, Kawamura T, Fujita Y, Honda H, Honma M. In silico prediction of chromosome damage: comparison of three (Q)SAR models. *Mutagenesis*. 2019, 34(1):91-100. doi: 10.1093/mutage/gy017.
  11. Amberg A, Anger LT, Bercu J, Bower D, Cross KP, Custer L, Harvey JS, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Leavitt P, Quigley DP, Miller S, Snodin D, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, White AT, Wichard J, Myatt GJ. Extending (Q)SARs to incorporate proprietary knowledge for regulatory purposes: is aromatic N-oxide a structural alert for predicting DNA-reactive mutagenicity? *Mutagenesis*. 2019, 34(1):67-82. doi: 10.1093/mutage/gy020. PubMed PMID: 30189015; PubMed Central PMCID: PMC6402318.
  12. You X, Ando T, Xi J, Cao Y, Liu W, Zhang X, Honma M, Masumura K, Luan Y. Gene mutation and micronucleus assays in *gpt* delta mice treated with 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether. *Mutagenesis*. 2018, 33:153-160
  13. Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. *In vivo* positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats. *Archives of Toxicology*. 2018, 92:3207-3221
  14. Aoki Y, Nakajima D, Matsumoto M, Yagishita M, Matsumoto M, Yanagisawa R, Goto S, Masumura K, Nohmi T. Change over time of the mutagenicity in the lungs of *gpt* delta transgenic mice by extract of airborne particles collected from ambient air in the Tokyo metropolitan area. *Genes and Environment*. 2018,40:25
  15. Hori H, Shimoyoshi S, Tanaka Y, Momonami A, Masumura K, Yamada M, Fujii W, Kitagawa Y. Integration of micronucleus tests with a gene mutation assay in F344 *gpt* delta transgenic rats using benzo[a]pyrene. *Mutation Research*. 2019, 837:1-7
  16. Maru, Y., Onuma, K., Ochiai, M., Imai, T., Hippo, Y.: Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoids. *Cancer Sci*. 110, 858-866 (2019)
  17. Ochiai, M., Yoshihara, Y., Maru, Y., Tetsuya, M., Izumiya, M., Imai, T., Hippo, Y.: Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgz024 (2019)
  18. Hori, M., Mutoh, M., Ishigamori, R., Imai, T., Takahashi, M.: Activated ductal

- proliferation induced by *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in fat-infiltrated pancreas of KK-*A<sup>y</sup>* mice. *In vivo* 32, 499-505 (2018)
19. Hattori, N., Niwa, T., Ishida, T., Kobayashi, K., Imai, T., Mori, A. Kimura, K., Mori, T., Asami, Y., Ushijima, T.: Antibiotics suppress colon tumorigenesis through inhibition of aberrant DNA methylation in an AOM/DSS colitis model. *Cancer Sci.* 110, 147-156 (2019)
  20. Machida, Y., Sudo, Y., Uchiya, N., Imai, T.: Increased susceptibility to mammary carcinogenesis and an opposite trend in endometrium in *Trp53* heterozygous knockout female mice by back-crossing the BALB/c strain onto the background C3H strain. *J. Toxicol. Pathol.* (In press, 2019).
  21. Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL. High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Res.* in press, 2019.
  22. Fukai, E, Sato, H, Watanabe, M, Nakae, D, Totsuka, Y, Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 2018, 109, 1024-1031.
  23. Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K.  $\gamma$ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology*, 2018, 38:537-543.
  24. Shimba Y, Togawa H, Senoo N, Ikeda M, Miyoshi N, Morita A, Miura S. Skeletal muscle-specific PGC-1 $\alpha$  overexpression suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Sci. Rep.*, (2019) 9, 4077.
  25. Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and  $\gamma$ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with o-toluidine and o-anisidine. *Arch. of Toxicol.*, (2019) in press
  26. Hashidume T, Sakano T, Mochizuki A, Ito K, Ito S, Kawarasaki Y, Miyoshi N. Identification of soybean peptide leginsulin variants in different cultivars and their insulin-like activities. *Sci. Rep.*, (2018) 8, 16847.
  27. Yagi M, Nakatsuji Y, Maeda A, Ota H, Kamikubo R, Miyoshi N, Nakamura Y, Akagawa M. Phenethyl isothiocyanate activates leptin signaling and decreases food intake. *PLoS One.*, (2018) 13, e0206748.
  28. Yoshikawa Y, Katayanagi Y, Kamiya M, Yamamoto Y, Fukutomi R, Imai S, Miyoshi N, Ohashi N. Tomato saponin supplementation ameliorates the development of experimental arthritis by regulating inflammatory responses. *J. Funct. Foods*, (2018) 49, 458-464.
  29. Hashidume T, Sasaki K, Hirata J, Kato M, Yoshikawa Y, Iwasaki Y, Arai H, Miura S, Miyoshi N. Effects of sanyaku and its constituent diosgenin on the fasted and postprandial hypertriacylglycerolemia in high-fat-diet-fed KK-*A<sup>y</sup>* mice. *J. Agric. Food. Chem.*, (2018) 66, 9968-9975.

30. Pervin M, Unno K, Ohishi T, Tanabe H, Miyoshi N, Nakamura Y. Beneficial effects of green tea catechins on brain function. *Molecules*, (2018) 23, E1297.
31. Miyoshi N. Biochemical properties of cholesterol aldehyde secosterol and its derivatives. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, (2018) 62, 107-114.
32. Tsuchiya Y, Sakai H, Hirata A, and Yanai T. Brazilian green propolis suppresses acetaminophen-induced hepatocellular necrosis by modulating inflammation-related factors in rats. *J. Toxicol. Pathol.* 31(4), 275-82, 2018.
33. Tsuchiya Y, Sakai H, Hirata A, and Yanai T. Effects of food restriction on the expression of genes related to acetaminophen-induced liver toxicity in rats. *J. Toxicol. Pathol.* 31(4), 267-74, 2018.
34. Goto M, Yonemaru K, Hirata A, Furuhashi H, Yanai T, and Sakai H. Lingual ganglioneuroma in a dog. *J. Vet. Med. Sci.* 80(3), 488-91, 2018.
35. Hirata A, Kaneko A, Sakai H, Nakamura S, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, Suzuki J. Laryngeal B cell lymphoma in a juvenile Japanese Macaques (*Macaca fuscata*). *J. Comp. Pathol.* in press
36. Goto M, Owaki K, Hirata A, Yanai T, and Sakai H. Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis to canine hemangiosarcoma cells in vitro. *Vet. Comp. Oncol.* in press
37. Hirata A, Miyamoto Y, Kaneko A, Sakai H, Yoshizaki K, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, and Suzuki J. Hepatic Neuroendocrine Carcinoma in a Japanese Macaques (*Macaca fuscata*). *J. Med. Primatol.*, 48(2), 137-40, 2019.
- 学会発表
1. 本間正充、医薬品中の変異原性不純物の安全性評価と管理、2018年 ISPE 日本支部年次大会、2018/5/24
  2. 本間正充、Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity、QSAR2018、2018/06/12、ブレッド・スロベニア
  3. 本間正充 遺伝毒性の新たな動き 第45回日本毒性学会学術年会、2018/7/20
  4. 本間正充、Mutagens and carcinogens in Japanese food: evolution of prioritized risk、第49回米国環境変異ゲノミクス学会、2018/9/26、サンアントニオ・米国
  5. 本間正充、(QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity、KNect365 Life Sciences Annual Meeting of Genotoxic Impurities、2018/10/24、ベルリン・ドイツ
  6. 本間正充、(QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity and its application to risk assessment、2018 Joint International Workshop "Progress of Genotoxicity Methods and Regulatory Acceptance、2018/11/27、広州・中国
  7. 安井学, 鷓飼明子, 福田隆之, 馬庭二郎, 山本春菜, 今村匡志, 藤島沙織, 大谷尚子, 成見香瑞範, 松崎香織, 岡田祐樹, 中川宗洋, 上田摩弥, 小川久美子, 本間正充: Ames 試験陽性のフォローアップに関するチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験の有用性の検討: MMS 共同研究の報告. 日本環境変異原学会第47回大会(2018.11.2)
  8. 竹入章, 松崎香織, 田中健司, 小川久美子, 安井学, 本間正充, 三島雅之: Ames 試験陽性のフォローアップとしての TK6 細胞を用い

- た $\gamma$ H2AX 評価系の有用性検討;MMS 共同研究オプション項目の報告. 日本環境変異原学会第47回大会(2018.11.1)
9. 増村健一: Ames 試験陽性のフォローアップと *in vivo* 試験. 日本環境変異原学会 BMS 研究会第57回定例会 熱川 (2018.7)
  10. 増村健一、安東朋子、豊田尚美、鶴飼明子、能美健彦、本間正充: マウス雄性生殖細胞と次世代個体ゲノムの点突然変異頻度の比較. 日本環境変異原学会第 47 回大会 京都(2018.11)
  11. Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N, Ando T, Ukai A, Nohmi T, Honma M: Absence of selection against ENU-induced point mutations in male germ cells during transmission to the next generation. 49th Annual Meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society. San Antonio, USA. (2018.9)
  12. 石井雄二, 菊池玲美花, 木島綾希, 高須伸二, 小川久美子, 梅村隆志「F344 ラットを用いたアセタミドの 28 日間反復投与による肝毒性評価」第 35 回日本毒性病理学会学術集会 (2019 年 2 月、東京)
  13. 今井俊夫、成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆: マウス大腸オルガノイドにおける PhIP 誘発がん早期過程における遺伝子変異. 第 65 回日本実験動物学会総会(2018 年 5 月、富山)
  14. 今井俊夫、成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆: マウス正常上皮組織由来オルガノイドの化学発がん物質に対する反応性. 第 25 回日本がん予防学会総会 (2018 年 6 月、高松)
  15. 成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆、今井俊夫: マウス正常上皮オルガノイドを用いた化学発がん過程の初期変化. 第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018 年 7 月、大阪)
  16. 今井俊夫: 新規 *in vivo*, *in vitro* モデルの発展とその応用 - マウス正常組織由来オルガノイドの化学発がん研究への応用. 第 35 回日本毒性病理学会学術集会シンポジウム 2 (2019 年 2 月、東京)
  17. Imai, T., Ochiai, M., Naruse, M., Hippo, Y.: Carcinogenic alteration of mouse tissue-derived organoids by chemical treatment. 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (2019年3月、ボルチモア、米国)
  18. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics (コルカタ、2018 年 1 月)
  19. 戸塚ゆ加里、秋場 望、佐藤春菜、前迫有也、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、十時 泰、柴田龍弘、中釜 斉: 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第 33 回発がん病理研究会 (御殿場、2018 年 8 月)
  20. 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二: 芳香族アミン類の代謝物分析と DNA 付加体 第 33 回発がん病理研究会 (御殿場、2018 年 8 月)
  21. Totsuka Y, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Nakagama H: Whole genome sequencing analysis elucidates the interaction between environmental factors and causes of human cancer. 第 77 回日本癌学会総会 (大阪、2018 年 9 月)
  22. 斎藤春五、高橋沙奈衣、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊: ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第 77 回日本癌学会総会 (大阪、2018 年 9 月)
  23. 高橋沙奈衣、斎藤春五、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊: Fe<sup>3</sup>O<sub>4</sub> ナノ粒子の曝露された癌細胞における microRNAs のプロファイリングについて

- (II) 第 77 回日本癌学会総会 (大阪、2018 年 9 月)
24. 戸塚ゆ加里、佐藤春菜、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、遠藤 治：全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
  25. 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里：マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
  26. 前迫侑也、椎崎一宏、高村岳樹、戸塚ゆ加里：職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析) 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
  27. 神尾翔真、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：ナノマテリアルの表面修飾が及ぼす遺伝毒性への影響 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
  28. 斎藤春吾、渡邊昌俊、戸塚ゆ加里：ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
  29. 石野孔祐、前迫侑也、内藤善哉、戸塚ゆ加里：質量分析データに基づく DNA 付加体データベースの整備 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
  30. 川上真由子、橋詰力、三好規之：キノコ抽出物における骨格筋萎縮予防化合物の探索、第 41 回日本分子生物学会 (横浜), 2018 年 11 月 28-30 日
  31. 橋詰力、永田光風、佐藤隆一郎、三好 規之：横浜大豆タンパク質 コングリシニン摂取時の脂質組成解析、第 41 回日本分子生物学会 (横浜), 2018 年 11 月 28-30 日
  32. 永田光風、橋詰力、伊藤圭祐、三浦進司、三好規之：TRPA1・TRPM8 を介した脂質組成変動によるロコモティブシンドローム予防法の検討、第 41 回日本分子生物学会 (横浜), 2018 年 11 月 28-30 日
  33. 田島悠也、豊田武士、平山裕一郎、橋詰力、松下幸平、小川久美子、渡辺賢二、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之：膀胱発がん性芳香族アミン o-toluidine の代謝物分析と DNA 付加体 Metabolomics and DNA adductome analysis of urinary bladder carcinogen o-toluidine, 日本環境変異原学会第 47 回大会 (京都), 2018 年 11 月 1-2 日
  34. 久富優太、小田美光、下原千晶、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、八木孝司、梶村春彦、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜：コリバクチン産生大腸菌の in vitro 遺伝毒性試験、日本環境変異原学会第 47 回大会 (京都), 2018 年 11 月 1-2 日
  35. 松山弘希、田中航、鈴木悠、三好規之、松浦靖、柚木崎千鶴子、宮崎達雄、道本英之、窄野昌信、榊原啓之：ApoE 欠損マウスを用いた天日干しダイコンの機能性の探索、平成 30 年度日本栄養・食糧学会 九週・沖縄支部大会 (宮崎), 2018 年 10 月 20-21 日
  36. 豊田武士、山田貴宣、三好規之、小川久美子：芳香族アミン誘発ラット膀胱発がん過程の初期段階における遺伝子発現動態、第 77 回日本癌学会学術総会 (大阪), 2018 年 9 月 27-29 日
  37. 平山裕一郎、田島悠也、恒松雄太、三好規之、若林敬二、渡辺賢二：検出困難な遺伝毒性物質コリバクチンを見出すための DNA 付加体の解析、日本生薬学会第 65 回大会 (広島), 2018 年 9 月 16-17 日
  38. 吉川祐人、鈴木悠、橋詰力、高垣晶子、平山裕一郎、岸本真治、渡辺 賢二、中村順行、原征彦、三好規之：ラット尿中の緑茶カテキン由来腸内細菌代謝物一斉分析、第 23 回日本フードファクター学会・第 12 回日本ポリフェノール学会・第 15 回日本カテキン学会・合同学術集会 (京都), 2018 年 9 月 7-8 日
  39. 加藤麻衣、橋詰力、吉田卓矢、田村謙太郎、中村俊之、中村宜督、三好規之：自然薯およ

- び自然薯むかごにおける有効成分ジオスゲニンの定量分析, 第 23 回日本フードファクター学会・第 12 回日本ポリフェノール学会・第 15 回日本カテキン学会・合同学術集会(京都),2018 年 9 月 7-8 日
40. 松山弘希, 田中航, 鈴木悠, 三好規之, 松浦靖, 柚木崎千鶴, 宮崎達雄, 道本英之, 窄野昌信, 榊原啓之: ApoE 欠損マウスを用いた天日干しダイコンの機能性の探索, 第 23 回日本フードファクター学会・第 12 回日本ポリフェノール学会・第 15 回日本カテキン学会・合同学術集会(京都),2018 年 9 月 7-8 日
41. 日高楓, 横山大悟, 田中航, 鈴木悠, 三好規之, 吹井伸二, 杉田卓也, 日高健太, 窄野昌信, 榊原啓之: マンゴーに含まれる成分と抗酸化活性に及ぼす熟度の影響, 第 23 回日本フードファクター学会・第 12 回日本ポリフェノール学会・第 15 回日本カテキン学会・合同学術集会(京都),2018 年 9 月 7-8 日
42. 梅林脩平, 妹尾奈波, 佐藤友紀, 三好規之, 吉田卓矢, 守田昭仁, 杉浦悠毅, 井上菜穂子, 亀井康富, 三浦進司: 骨格筋中リン脂質と骨格筋機能との関連の解明, 第 73 回日本体力医学会大会(福井), 2018 年 9 月 7-9 日
43. 梅林脩平, 妹尾奈波, 佐藤友紀, 三好規之, 吉田卓矢, 守田昭仁, 杉浦悠毅, 井上菜穂子, 亀井康富, 三浦進司: 骨格筋中リン脂質と骨格筋機能との関連の解明, 日本筋学会第 4 回学術集会(岡山), 2018 年 8 月 10-11 日
44. 三浦進司, 妹尾奈波, 梅林脩平, 守田昭仁, 三好規之, 亀井康富: 転写共役因子 PGC-1 によって制御される骨格筋リポクオリティー, 日本筋学会第 4 回学術集会(岡山),2018 年 8 月 10-11 日
45. 平山裕一郎, 松崎信生, 玉舟亮太, 恒松雄太, 佐藤道大, 吉川悠子, 三好規之, 岩下雄二, 梶村春彦, 若林敬二, 武藤倫弘, 石川秀樹, 渡辺賢二大: 腸がんリスク因子物質コリバクチンの生産菌検出に関する化学的研究, 第 24 回日本がん予防学会(高松),2018 年 6 月 27-28 日
46. 豊田武士, 戸塚ゆ加里, 松下幸平, 森川朋美, 山田貴宣, 三好規之, 若林敬二, 小川久美子: 膀胱がんリスク因子としてのノルハルマン代謝物:ラットを用いた検討,第 24 回日本がん予防学会(高松),2018 年 6 月 27-28 日
47. 河合柚子, 橋詰力, 眞鍋康子, 藤井宣晴, 中村宜督, 三好規之: 食品因子 isothiocyanate 類が結合した炎症性サイトカイン MIF の機能解析, 第 72 回日本栄養・食糧学会大会(岡山),2018 年 5 月 11-13 日
48. 加藤麻衣, 橋詰力, 庄司豊, 庄司(加藤)久美子, 五十嵐美樹, 早川清雄, 吉川悠子, 三好規之: 高脂肪食を摂取した NASH 肝発がんモデルマウス糞便中揮発性化合物の分析, 第 72 回日本栄養・食糧学会大会(岡山),2018 年 5 月 11-13 日
49. 吉川悠子, 恒松雄太, 松崎信生, 平山裕一郎, 佐藤道大, 三好規之, 岩下雄二, 梶村春彦, 若林敬二, 渡辺賢二: 大腸がん患者から分離された遺伝毒性物質コリバクチン陽性菌の解析 Prevalence of colibactin-positive bacteria in colorectal cancer patients ,第 91 回日本細菌学会総会(福岡),2018 年 5 月 11-13 日
50. 丸喜明, 筆宝義隆:マウス胃オルガノイドへの包括的な遺伝子導入による胃発がん過程の再現、ポスター、第 16 回がんとハイポキシア研究会(2018 年 11 月千葉)
51. 丸喜明, 筆宝義隆:マウス胃細胞の 3 次元培養を用いた胃発がん過程の再現、ポスター、第 27 回日本癌病態治療研究会(2018 年 5 月千葉)
52. Masashi Izumiya, Masako Ochiai, Yasunori Yoshihara, Yoshiaki Maru, Matsuura Tetsuya, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo: Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids、口演、第 33 回発癌病理研究会(2018 年 8 月御殿場)
53. 泉谷昌志, 吉原靖典, 丸喜明, 落合雅子, 松

浦哲也、今井俊夫、筆宝義隆:変異遺伝子の  
in vitro 再構成による胆管細胞発がんの誘導、  
ポスター、第 77 回 日本癌学会学術総会  
(2018 年 9 月大阪)

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

特になし