

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
平成 30 年度総括研究報告書

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）

研究代表者 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 教授

研究要旨

本研究は化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化を可能とする評価モデルの構築を目指し、 γ -H2AX を用いた短期膀胱発がんリスク評価法の確立及び遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性の検証を行った。本年度は、 γ -H2AX を用いた短期膀胱発がんリスク評価法では、膀胱発がん物質等 10 物質について、ラットを用いた 28 日間反復経口投与試験を実施した。膀胱粘膜上皮における γ -H2AX 形成を免疫組織化学的に検討した結果、膀胱発がん物質 6 物質中 4 物質で有意に増加した。以上の結果から、 γ -H2AX の膀胱発がん性早期検出マーカーとして有用性が示された。また、以前の検討で γ -H2AX 形成の増加を示さなかった膀胱発がん物質 4 物質について投与条件を変更した再検討を実施した結果、1 物質で γ -H2AX の有意な増加が認められた。これまでに蓄積された 54 物質のデータを総合すると、 γ -H2AX 免疫染色によって化学物質のラット膀胱に対する発がん性を、感度 84.4% (27/32) 及び特異度 100% (22/22) と、高い精度で予測できることが示された。以上の結果を受けて、化学物質の膀胱発がん性早期検出を目的とした「膀胱における γ -H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与と毒性試験に対する既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に、オプションとして追加する改定案 (Standard Project Submission Form; SPSF) を厚生労働省を通じて提出した。また、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性の検証では、遺伝毒性肝発がん物質等 28 物質についてラット単回投与を行い、投与 24 時間後の肝臓におけるマーカー遺伝子 (10 遺伝子) の発現データを qPCR で取得し、予測モデルで肝発がん性を予測させた。肝臓をターゲットとしない発がん物質や非遺伝毒性非発がん物の合計 15 物質はすべて陰性と判定された。一方で、遺伝毒性肝発がん物質の 13 物質 (陽性対照を除く) のうち、7 物質は陰性と判定され、偽陰性となった。これまでに取得した 59 物質のデータを総合すると、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度 70.8% (17/24) 及び特異度 97.1% (34/35) と、比較的高い精度で検出できる可能性が示唆された。

研究分担者

豊田武士	国立医薬品食品衛生研究所病理部 室長
鈴木周五	名古屋市立大学 実験病態病理学 講師
魏 民	大阪市立大学 分子病理学 准教授
横平政直	香川大学医学部 腫瘍病理学 准教授
塚本徹哉	藤田医科大学 病理診断学 教授
戸塚ゆ加里	国立がん研究センター研究所 ユニット長

A . 研究目的

生活環境を取り巻く化学物質の発がん性を迅速にかつ高精度に検証できるシステムの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、システムで得られた結果は国民生活の安全・安心を保障する。本研究では化学物質の発がん性評価の迅速化・高精度化・標準化を目的に、平成23年度～28年度「化学物質の安全性と発がん性リスク評価としての短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究」(吉見班)で蓄積してきた病理組織発がんマーカー及び試験法をより一層高精度化し、確立する必要がある。さらに国際的に認知させる必要があるため、それらの発がん性評価法の OECD テストガイドライン化を目指すことが重要である。そこで、本申請研究においては、OECD テストガイドラ

イン化の成立を目指して、6研究施設による協同体制にて下記の研究を実施する。膀胱を標的とする発がん物質を用いた28日間反復投与試験及び大腸を標的とする発がん物質を用いた90日間反復投与試験を実施し、病理組織発がんマーカーを用いた大腸及び膀胱発がんリスク評価法を確立する。また、これまで開発した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性をより一層検証し、確立する。さらに、上記の試料を用いてDNA付加体を網羅的に解析しカタログ化する方法(アダクトーム解析)による化学物質のDNA損傷を指標とした遺伝毒性評価法を開発する。本研究の意義は、成果となる発がん性評価法及びガイドラインが、化学物質の有害性評価において汎用的に用いられかつ厚生労働行政施策の科学的基盤となることであり、得られた発がん性に関する情報は厚生労働行政施策への活用が非常に期待できる。また、得られる成果は国内のみならず、化学物質の安全性評価に係る国際的な試験法やガイドライン等への活用も期待される。

平成 30 年度は、膀胱発がん物質 6 種類、膀胱発がんプロモーター物質 2 種類及び非膀胱発がん物質 2 種類 (国立衛研/豊田、名古屋市立大/鈴木) についてラット 28 日間反復投与試験を実施し、 γ -H2AX の膀胱発がん

ん性早期検出指標としての有用性を検証した。また、以前の検討で -H2AX 形成の増加を示さなかった膀胱発がん物質 4 種 : Dimethylarsinic acid (DMA), 4-Amino-2-nitrophenol (ANP), ニトリロ三酢酸三ナトリウム一水和物 (NTA), *N*-Nitrosomorpholine (NMOR) について、投与条件を変更した再検討を実施した。さらに、化学物質の膀胱発がん性早期検出を目的とした「膀胱における -H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与毒性試験に対する既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に、オプションとして追加する改定案 (Standard Project Submission Form; SPSF) を厚生労働省を通じて提出した。

我々が構築した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性の検証では、16 種類の遺伝毒性肝発がん物質及び 12 種類のそれ以外の化合物 (非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の発がん物質、非発がん物質) について、ラット単回投与試験を行い、得られた遺伝子発現データを予測モデルに入力し、判定を行った (大阪市立大/鰐淵・魏、香川大/横平、藤田医科大/塚本)。さらに、DNA アダクトーム解析を用いて化学物質の DNA 損傷を指標とした安全性評価法を確立するために、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルで得られた肝臓組織を用いて化学物質の投与に相関する付加体群について検討した (国立がん研究センター/戸塚、大阪市立大/鰐淵)。

B . 研究方法

1 . -H2AX を用いた膀胱発がんリスク評価法の確立 (豊田、鈴木)

名古屋市大担当分として、膀胱発がん物質 3 種 : *N*-Butyl-*N*-(3-carboxypropyl)nitrosamine (BCPN)、1-Naphtyl-*N*-methylcarbamate (Carbaryl)、Tributyl phosphate (TBP)、膀胱発がんプロモーター物質 : Saccharin sodium salt dihydrate (Na-Sac) 及び非膀胱発がん物質 : 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO) を、6 週齢の雄 F344 ラットに 28 日間投与した。各物質の投与濃度/経路は、報告されている発がん性試験の方法に基づき、0.028% BCPN 飲水、0.0025% 4NQO 飲水、0.75% Carbaryl 混餌、0.3% TBP 混餌、5% Na-Sac 混餌投与した。

国立衛研担当分として、膀胱発がん物質 3 種 : 2-Nitrosotoluene (2-NT)、*m*-Cresidine (*m*-Cre)、Sulfasalazine (SSZ)、膀胱発がんプロモーター物質 1 種 : Sodium L-ascorbate (Na-AsA) 及び非膀胱発がん物質 : 2-Nitropropane (2-NP) を、6 週齢の雄 F344 ラットに 28 日間経口投与した。各物質の投与濃度/経路は、報告されている発がん性試験の方法に基づき、0.338% 2-NT 混餌、160 mg/kg/day *m*-Cre 強制経口 (溶媒 : コーン油)、675 mg/kg/day SSZ 強制経口、5% Na-AsA 混餌、40 mg/kg/day 2-NP 強制経口投与に設定した。また、偽陰性物質の再検討として、Dimethylarsinic acid (DMA)、4-Amino-2-nitrophenol (ANP)、ニトリロ三酢酸三ナトリウム一水和物 (NTA)、*N*-Nitrosomorpholine (NMOR) を 1 週 (0.02% DMA 飲水、2% NTA 混餌) または 4 週間 (0.015% DMA 飲水、0.5% ANP 混餌、0.0125% NMOR 飲水、2% NTA 混餌) 経口投与した。4 週間 NTA 投与群

には、同物質への発がん感受性が高い雌 F344 ラットを用いた。

膀胱の採材は、先行研究で作成した多施設での共通臓器処理マニュアルに従った。膀胱のホルマリン固定パラフィン包埋標本を作製し、免疫組織化学的手法により -H2AX 形成を実施した。

2 . 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立 (鰐淵、魏、横平、塚本)

遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質 28 種類について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。動物試験は 3 施設 (香川大・藤田医科大・大阪市立大) で行われた。実験動物は 6 週齢の雄 SD ラットを用いた。動物試験プロトコールは事前に共有・配布し、プロトコールに従い試験を実施した。被験物質と投与濃度 (各物質の LD50 の 1/3) 表 1 の通りである。

被験物質投与後 24 時間後に剖検を行った。肝臓を摘出し、RNA 抽出用として、外側左葉 (LL) を摘出後、下端辺縁部を約 2cm x 0.5cm の大きさで 2 スライス切り出し、それぞれ 1mL の RNA later が入った 1.5mL チューブへ移した (合計 2 本、そのうち 1 本は、他施設でのバリデーション用)。1.5mL チューブを 4℃ で一晩保管後、-80℃ へ長期保管した。凍結保存サンプル用として、外側左葉の上半分を 1.5mL チューブ 2 本分採取し、液体窒素により凍結後、-80℃ 凍結保管した (一本は DNA adduct 解析用)。ホルマリン固定用サンプルとして、外側左葉の下半分、内側右葉 (RM) 及び右葉尾部 (R2) から計 3 スライス切り出し、カセットにおいて 10%ホルマリンにて固定した。

遺伝子発現については、リアルタイム PCR にてデータを取得した。リアルタイム RT-PCR は施設共通のプロトコールに従って行った。肝臓からの total RNA 抽出と cDNA の合成はそれぞれ RNeasy mini kit (キアゲン) と Super Script VI VIL0 Master Mix (invitrogen) のキットを使用した。

各施設で得られた遺伝子発現データを我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル (サポートベクターマシンのによる数理的アルゴリズムによるモデル) に入力し、判定を行った。

3 . DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価 (鰐淵、戸塚)

遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの検証試験で遺伝毒性肝発がん物質 10 種類 (2-Nitropropane, (2-NP), *o*-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 4,4-Thiodianiline (TDA), *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-Nitrosodiethanolamine (NDELA), *N*-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), Nitrosodibutylamine (NB), *N*-Nitrosopyrrolidine (NNP), 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (MDA))、遺伝毒性非発がん物質 3 種類 (Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT))、非遺伝毒性肝発がん物質 2 種類 (Monocrotaline (MCT), Phenobarbital (PB))、非遺伝毒性非肝発がん物質 16 種類 (Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tol

butamide(TLB), Aspirin(ASA), Triamterene(TRI), Indomethacin(IM), Phenylbutazone(PhB), Promethazine(PMZ), Sulindac(SUL), Tetracycline(TC), Ethionamide(ETH), Theophylline(TEO), Caffeine(CAF), Chloramphenicol(CMP))を投与したラット肝臓より DNA を抽出した。DNA を抽出後、DNaseI、ヌクレアーゼ P1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、LC-TOF MS に供し DNA 付加体の網羅解析を行った。なお、コントロールとして 0.5%メチルセルロースを用いた。得られたデータは SCIEX 社が提供するバイオインフォマティクス解析ソフトウェアを用い、デオキシリボヌクレオチドに特徴的なニュートラルロス (-116.04736) 及び各種核酸に特異的なニュートラルロス (-152.0572; dG, -136.0623; dA, -112.0511; dC, -127.0508; dT) を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように系をデザインした。得られたデータを主成分 (PCA-DA)解析により解析した。

(倫理面への配慮)

各施設の動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

C. 研究結果

1. -H2AX を用いた膀胱発がんリスク評価法の確立 (豊田、鈴木)

膀胱粘膜上皮における -H2AX 形成を免疫組織化学的に検討した結果、膀胱発がん物質 6 物質中 4 物質 (BCPN, Carbaryl, TBP 及び 2-NT) で有意に増加した。一方で、非膀胱発がん物質 2 物質 (4NQO, 2-NP) では対照群と有意な差は認められなかった。また、膀胱発がんプロモーター物質である Na-Sac では有意な増加、Na-AsA では増加傾向がみられた。

以前の検討で -H2AX 形成の増加を示さなかった膀胱発がん物質 4 物質について再検討した結果、NTA を 1 週間投与した雄および 4 週投与後の雌において、有意な増加が認められた。0.5% ANP および 0.015% DMA の 4 週投与群においても増加傾向がみられたものの、統計学的有意差は認められなかった。

2. 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立 (鰐淵、魏、横平、塚本)

各施設で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った(表 1)。本モデルでは、遺伝毒性肝発がん物質を「陽性」、その他の物質を「陰性」と判定する。その結果、遺伝毒性肝発がん物質 13 物質のうち、6 物質について陽性判定が得られ (感度 46%)、その他の全ての物質 (15 物質) で陰性判定が得られた (特異度 100%)。

表 1. 遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた判定結果

	被検物質	投与量 (mg/kg)	判定結果
Ames(+) 肝発がん性(+)	2-Nitropropane (2-NP) (陽性対照物質)	240	Positive
	Nitrosoheptamethyleneimine (NHMI)	90	Positive
	Ethylene thiourea (ETU)	610	Negative
	Benzidine (BZ)	100	Negative
	Auramine-O (AO)	500	Positive
	Hydrazine (HZ)	20	Negative
	4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)	240	Negative
	4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline) (MBOCA)	380	Positive
	Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate (TDPPP)	620	Positive
	Retrovirus (RTS)	10	Positive
	Vinyl bromide (VB)	170	Negative
	Dichloroacetic acid (DCA)	940	Negative
	Hydrazine sulfate (HS)	200	Negative
	Acid Red 26 (AR-26)	2000	Positive
	Hexachlorobenzene (HCB)	2000	Negative
Ames(-) 肝発がん性(+)	Carbon tetrachloride (CCL4)	780	Negative
	Gemfibrozil (GFZ)	470	Negative
	Ethinylestradiol (EE)	320	Negative
	Coumarin	100	Negative
Ames(+) 発がん性(-)	2,4-Dinitrotoluene (DNT)	100	Negative
	Isoniazid (INH)	420	Negative
Ames(-) 肝以外発がん性(+)	Butylated hydroxyanisole (BHA)	670	Negative
	Methimazole (MTZ)	750	Negative
	Sulfasalazine (SS)	2000	Negative
Ames(-) 発がん性(-)	Allyl alcohol (AA)	20	Negative
	Furosemide (FUR)	870	Negative
	Chlorpheniramine (CHL)	40	Negative
	Chlorpropamide (CPP)	720	Negative
	Methyldopa (MDP)	1670	Negative

3. DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価 (鰐淵、戸塚)

PCA-DA 解析を行なったところ、コントロール(0.5%メチルセルロース)及び非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の 4 つのグループに分離されることがわかった(図 1)。前回の報告と同じく、非遺伝毒性非発がん物質及びコントロール、遺伝毒性肝発がん物質で PCA-DA 解析を行ったところコントロールと非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の 2 つのグループに分離できた。非遺伝毒性非発がん物質ではコントロールと分離が出来ていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいことが予測された。遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質では距離があまり離れていないプロットが存在した。そこで、遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質においてコントロールとともに PCA-DA 解析を行ったところコントロールと遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質それぞれで分離することができた。そのため、非遺伝毒性物質と遺伝毒性非発がん物質は本来であれば、別の物質として区別することはできるが、コントロールや非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質と比較すると比較的差が小さいため分離が出来なかったと予測された。しかし、非遺伝毒性肝発がん物質は遺伝毒性非発がん物質と比べ比較的遺伝毒性肝発がん物質よりにプロットされている傾向があることから、プロットにおいて、発がん性の有無の要素の関与が大きいと予測された。これらのことから、発がんに関与する物質である DNA 付加体が生成されて

いることが推測される。

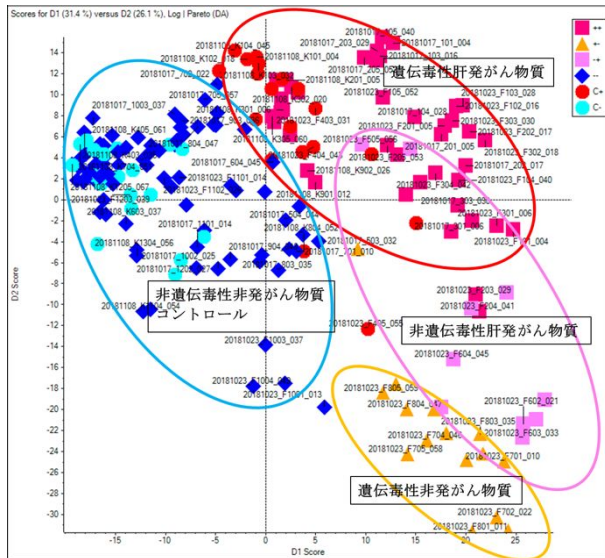


図 1. 化学物質投与したラット肝臓における DNA 損傷性の評価(PCA-DA 解析による)

D. 考察

本研究で検討した 6 種の膀胱発がん物質のうち、4 物質で有意に増加した。一方で、非膀胱発がん物質では H2AX 標識率が対照群と差がなく、検出法の膀胱発がん物質への特異性についても示された。

再検討を実施した膀胱発がん物質 4 種のうち、NTA は雄の 1 週投与群および雌の 4 週投与群において、-H2AX 形成の有意な増加を示した。NTA の 2%混餌投与によるラット 2 年間発がん性試験において、膀胱腫瘍発生率は雄で 4% (1/24) 雌で 21% (5/24) と、雌の方が感受性が高いことが報告されている (米国: National Toxicology Program)。-H2AX による膀胱発がん性の検出は、発がん感受性の雌雄差を反映し得ることが示唆された。

これまでに蓄積されたデータを総合すると、-H2AX 免疫染色によって化学物質のラット膀胱に対する発がん性を、感度 84.4%(27/32)および特異度 100%(22/22)と、高い精度で予測できることが示された。以上の結果を受けて、「膀胱における -H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与毒性試験に対する既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に追加する改定案 (Standard Project Submission Form; SPSF) を、厚生労働省を通じて提出した (図 2)。

本改定案は化学物質の膀胱発がん性早期検出を目的として、膀胱を用いた -H2AX 免疫染色をオプションとして追加するものである。免疫染色は多くの研究機関で実施されている一般的な解析手法であり、既存の試験への組み込みが容易である。また、早期に発がん性を検出することで、不要な長期がん原性試験の実施を回避でき、実験動物の 3R にも貢献し得る。一方で、本手法のみでは膀胱発がん過程における遺伝毒性機序の関与を評価することはできず、別個の試験・情報が必要となる。他のマーカーとの併用等、今後の検討課題と考えられる。

遺伝毒性肝発がん物質検出モデルの検証では、肝臓を

ターゲットとしない発がん物質や非遺伝毒性非発がん物の合計 15 物質はすべて陰性と判定された。一方で、遺伝毒性肝発がん物質の 13 物質 (陽性対照を除く) のうち、7 物質は陰性と判定され、偽陰性となった。今回用いた遺伝毒性肝発がん物質について、その投与した用量と腫瘍発生率が 50%となる用量 (TD50) を比較検討した結果、大半が「投与量/TD50」比率が 100 以下であり (表 2)、平成 29 年度 (平均: 531) に比べ、低いことが判明した。

これまでに取得した 59 物質のデータを総合すると、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度 70.8%(17/24)及び特異度 97.1%(34/35)であった。特に、上記の「投与量/TD50」比率について、100 以上となる物質では、感度 100%(9/9)となる一方で、100 未満の場合には、感度 50%(7/14)と低くなることが判明し、発がん感受性用量に対する投与量割合が、遺伝子発現変化および遺伝毒性肝発がん物質検出モデル検出率に寄与した可能性がある。一方で、特異度は 97.1%と高く、本検出モデルの特異性を強く示した。

遺伝毒性/非遺伝毒性非肝発がん物質を投与したラットの肝臓から DNA を抽出し、アダクトーム法を用いて DNA 付加体の網羅解析を行なった。PCA-DA 解析を行なったところ、コントロール及び非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の 4 つのグループに分離されることがわかった。非遺伝毒性非発がん物質ではあまりコントロールと分離が出来ていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいことが予測された。遺伝毒性非発がん物質と比べて、非遺伝毒性肝発がん物質は、遺伝毒性非発がん物質に近いプロットされる傾向にあり、発がん性の有無の要素の関与が大きいと予測された。これらのことから、発がんに関与する物質である DNA 付加体が生成していることが考えられる。

表 2. 遺伝毒性肝発がん物質の判定結果および TD50 との関係

被検物質	投与量 (mg/kg)	判定結果	TD50 (mg/kg/day)	Folds (投与量/TD50)	I129	I130
2-Nitropropane (2-NP) (陽性対照物質)	240	Positive	-	-		
N-Nitrosodiethylamine (NDEA)	70	Positive	0.0265	2642	○	
Nitrosocaptamethylencimine (NHMD)	90	Positive	0.0378	2381		○
N-Nitrosodithanolamine (NDELA)	2000	Positive	3.17	631	○	
N-Nitrosoethylmethylamine (DEMA)	30	Positive	0.0503	596	○	
Nitrosodibutylamine (DBA)	400	Positive	0.691	579	○	
N-Nitrosopyrrolidine (NPA/R)	300	Positive	0.799	375	○	
2-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (DMAB)	500	Positive	3.28	152	○	
α-Aminozotoluene (AAT)	500	Positive	4.04	124	○	
N-Nitrosodimethylamine (DMN)	10	Positive	0.0959	104	○	
4,4'-Thiodianiline (TDA)	300	Positive	3.71	81	○	
Ethylene thiourea (ETU)	610	Negative	8.13	75		○
Benzidine (BZ)	100	Negative	1.73	58		○
Auramine-O (AO)	500	Positive	11.0	45		○
Hydrazine (H2)	20	Negative	0.613	33		○
4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)	240	Negative	9.51	25		○
Monocrotaline (MCT)	20	Positive	0.940	21		○
4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline) (MBOCA)	380	Positive	19.3	20		○
Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phosphite (TDCPP)	620	Positive	46.4	13		○
Retrosiline (RTS)	10	Positive	0.862	12		○
Vinyl bromide (VB)	170	Negative	18.5	9		○
Dichloroacetic acid (DCA)	940	Negative	16.1	6		○
Hydrazine sulfate (HS)	200	Negative	40.8	5		○
Acid Red 26 (AR-26)	2000	Positive	415	5		○

OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME
Standard Project Submission Form

If you require further information please contact the OECD Secretariat
Return completed forms to:
Anne Gourmelon (anne.gourmelon@oecd.org)
and Christina Quaglio (christina.quaglio@oecd.org)

PROJECT TITLE

Update of the repeated dose oral toxicity 28-day study (OECD TG 407) with optional inclusion of immunohistochemistry for γ -H2AX in the urinary bladder

SUBMITTED BY (Country / European Commission / Secretariat)

Japan

DATE OF SUBMISSION TO THE SECRETARIAT

31 October 2018

DETAILS OF LEAD COUNTRY/CONSORTIUM

Country/Organisation:	Japan
Agency/Ministry/Other:	National Institute of Health Sciences, NIHS / Ministry of Health, Labour and Welfare, MHLW
Mail Address:	NIHS: 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan MHLW: 1-2-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8916, Japan
Phone/fax:	NIHS: (phone) +81-44-270-6651, (fax) +81-44-270-6655/ MHLW: (phone) +81-3-3595-2298
Email:	NIHS: Htoyoda@nihs.go.jp MHLW: tsukano-masaaki12@mhlw.go.jp

図 2. 既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に、 γ -H2AX 免疫染色による膀胱発がん性早期検出法の追加を提案する SPSF (表紙)。(厚生労働省を通じて提出)

E. 結論

本研究の結果から、 γ -H2AX 免疫染色は、化学物質の膀胱発がん性早期検出マーカーとして応用できることが示された。平成 31 年度は、提出したガイドライン改定案について、OECD ワーキンググループ (Working Group of the National Coordinators for the Test Guidelines Programme; WNT) からの指摘に対して必要な対応を実施する。また、我々が構築した遺伝子セットを用いた肝発がん性予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を高い精度で検出できる可能性が示唆された。今後も本試験系の限界や改良についての検証を引き続き行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, Wanibuchi H. Acetoaceto-*o*-toluidide enhances cellular proliferative activity in the urinary bladder of rats. Toxicol Sci. 2019, in press.
- 2) Sone M, Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Morikawa T, Nishikawa A, Ogawa K. Immunohistochemistry of γ -H2AX as a method of early detection of urinary bladder carcinogenicity in mice. J Appl Toxicol. 2019, in press.
- 3) Toyoda T, Cho YM, Matsushita K, Tachibana S, Senuma M, Akagi J, Ogawa K. A 13-week subchronic

- toxicity study of hexyl acetate in SD rats. J Toxicol Pathol. 2019, in press.
- 4) Nakagawa, M., Sakai, Y., Kiriya, Y., Tahara, T., Horiguchi, N., Okabe, A., Tahara, S., Shibata, T., Ohmiya, N., Kuroda, M., Sugioka, A., Tsukamoto, T. Eradication of *Helicobacter pylori* Induces Immediate Regressive Changes in Early Gastric Adenocarcinomas. Pathobiology. 2019: in press.
- 5) Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with *o*-toluidine and *o*-anisidine. Arch Toxicol. 2019; 93: 753-62.
- 6) Yang Q, Yasuda T, Choi E, Toyoda T, Roland JT, Uchida E, Yoshida H, Seto Y, Goldenring JR, Nomura S. MEK inhibitor reverses metaplasia and allows re-emergence of normal lineages in *Helicobacter pylori*-infected gerbils. Gastroenterology. 2019; 156: 577-81.
- 7) Hirata T, Cho YM, Suzuki I, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC) induced apoptotic cell death and G2/M cell cycle arrest via ROS production in human esophageal epithelial cancer cells. J Toxicol Sci. 2019; 44: 73-81.
- 8) Funahashi S, Okazaki Y, Nagai H, Chew SH, Ogawa K, Toyoda T, Cho YM, Toyokuni S. Twist1 was detected in mesenchymal cells of mammary fibroadenoma and invasive components of breast carcinoma in rats. J Toxicol Pathol. 2019; 32: 19-26.
- 9) Mapoung, S, Suzuki, S, Fuji, S, Naiki-Ito, A, Kato, H, Yodkeeree, S, Ovatlarnporn, C, Takahashi, S, Limtrakul, P. Cyclohexanone curcumin analogs inhibit the progression of castration resistance prostate cancer in vitro and in vivo. Cancer Sci. 2019; 110: 596-607.
- 10) Okabe, A, Kiriya, Y, Suzuki, S, Sakurai, K, Teramoto, A, Kato, H, Naiki-Ito, A, Tahara, S, Takahashi, S, Kuroda, M, Sugioka, A., Tsukamoto, T. Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker γ -H2AX. J Toxicol Pathol. 2019; 32: 91-99.
- 11) Tahara, S, Tahara, T, Horiguchi, N, Kato, T, Shinkai, Y, Yamashita, H, Yamada, H, Kawamura, T, Terada, T, Okubo, M, Nagasaka, M, Nakagawa, Y, Shibata, T, Yamada, S, Urano, M, Tsukamoto, T, Kurahashi, H, Kuroda, M, Ohmiya, N. DNA methylation accumulation in gastric mucosa adjacent to cancer after *Helicobacter pylori* eradication. Int J Cancer. 2019; 144: 80-88.
- 12) Okuno T, Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Gi M,

- Wanibuchi H. mTOR Activation in Liver Tumors Is Associated with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Both Mouse Models and Humans. *Cancers (Basel)*. 2018; 10: 465.
- 13) Gi M, Fujioka M, Yamano S, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Yamaguchi T, Tago Y, Kitano M, Hayashi SM, Wanibuchi H. Chronic dietary toxicity and carcinogenicity studies of dammar resin in F344 rats. *Arch Toxicol*. 2018; 92: 3565-83.
 - 14) 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. *Arch Toxicol*. 2018; 92: 3207-21.
 - 15) Fukushima S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Matsumoto M. Quantitative Approaches to Assess Key Carcinogenic Events of Genotoxic Carcinogens. *Toxicol Res*. 2018; 34: 291-6.
 - 16) Shimizu Y, Tamada S, Kato M, Takeyama Y, Fujioka M, Kakehashi A, Nakatani T, Wanibuchi H, Gi M. Steroid sulfatase promotes invasion through epithelial-mesenchymal transition and predicts the progression of bladder cancer. *Exp Ther Med*. 2018; 16: 4463-70.
 - 17) Oikawa D, Shiota M, Tokunaga F, Wanibuchi H. Generation of Rat Monoclonal Antibodies Specific for DZIP3. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2018; 37: 153-7.
 - 18) Oikawa D, Shiota M, Goto E, Komakura K, Wanibuchi H, Tokunaga F. Generation of Rat Monoclonal Antibodies Against a Deubiquitinase, Ovarian Tumor Domain-Containing Protein 1. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2018; 37: 180-4.
 - 19) Kitajima S, Lee KL, Fujioka M, Sun W, You J, Chia GS, Wanibuchi H, Tomita S, Araki M, Kato H, Poellinger L. Hypoxia-inducible factor-2 alpha up-regulates CD70 under hypoxia and enhances anchorage-independent growth and aggressiveness in cancer cells. *Oncotarget*. 2018; 9: 19123-35.
 - 20) Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of acetaminophen using an obese rat model. *J Toxicol Sci*. 2018; 43: 423-33.
 - 21) Tanoue Y, Toyoda T, Sun J, Mustofa MK, Tateishi C, Endo S, Motoyama N, Araki K, Wu D, Okuno Y, Tsukamoto T, Takeya M, Ihn H, Vaziri C, Tateishi S. Differential roles of Rad18 and Chk2 in genome maintenance and skin carcinogenesis following UV exposure. *J Invest Dermatol*. 2018; 138: 2550-7.
 - 22) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Takahashi M, Inoue K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-ethylbutanal in F344 rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018; 100: 118-26.
 - 23) Akagi J, Cho YM, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Subchronic toxicity evaluation of 5-hexenyl isothiocyanate, a nature identical flavoring substance from *Wasabia japonica*, in F344/DuCrj rats. *Food Chem Toxicol*. 2018; 122: 80-6.
 - 24) Furihata C, Toyoda T, Ogawa K, Suzuki T. Using RNA-Seq with 11 marker genes to evaluate 1,4-dioxane compared with typical genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens. *Mutat Res*. 2018; 834: 51-5.
 - 25) Ito, Y, Naiki-Ito, A, Kato, H, Suzuki, S, Kuno, T, Ishiguro, Y, Takahashi, S, Uemura, H. Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by down-regulation of androgen receptor. *Oncotarget*. 2018; 9: 13859-69.
 - 26) Suzuki, S, Cohen, SM, Arnold, LL, Kato, H, Fuji, S, Pennington, KL, Nagayasu, Y, Naiki-Ito, A, Yamashita, Y, Takahashi, S. Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis. *Toxicology*. 2018; 398-399: 31-40.
 - 27) Naiki, T, Naiki-Ito, A, Iida, K, Etani, T, Kato, H, Suzuki, S, Yamashita, Y, Kawai, N, Yasui, T, Takahashi, S. GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis. *Oncotarget*. 2018; 9: 15847-59.
 - 28) Hayashi, Y, Nishiyama, T, Nakatochi, M, Suzuki, S, Takahashi, S, Sugiura-Ogasawara, M. Association of genetic variants of PD1 with recurrent pregnancy loss. *Reprod Med Biol*. 2018; 17: 195-202.
 - 29) Takeshita, S, Yamashita, Y, Shiomi, K, Suzuki, N, Yoshida, J, Naiki-Ito, A, Suzuki, S, Akatsuka, S, Toyokuni, S, Takahashi, T, Mase, S, Arakawa, A, Sugiura-Ogasawara, M, Takahashi, S. Expression of P-REX2a is associated with poor prognosis in endometrial malignancies. *Oncotarget*. 2018; 9: 24778-86.
 - 30) Suzuki, S, Kato, H, Fuji, S, Naiki, T, Naiki-Ito, A, Yamashita, Y, Takahashi, S. Early detection of prostate carcinogenesis by immunohistochemistry of HMGB2. *J Toxicol Sci*. 2018; 43: 359-67.
 - 31) Kuno, T, Kato, H, Naiki-Ito, A, Suzuki, S, Tanaka, T, Takahashi, S, Mori, H. Preventive effects of fermented brown rice and rice bran on spontaneous lymphomagenesis in AKR/NSIc female mice. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018; 19: 3217-23.

- 32) Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Hashimoto N, Kanie S, Yoshida S, Imaida K., Characteristics of surfactant proteins in tumorigenic and inflammatory lung lesions in rodents. *J. Toxicol. Pathol.*, 31(4): 231-40. 2018.
- 33) 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: 1024-31.
- 34) Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two nonharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology.* 2018; 38: 537-43.
- 35) Yokohira M, Nakano-Narusawa Y, Yamakawa K, Hashimoto N, Yoshida S, Kanie S, Imaida K. Validating the use of napsin A as a marker for identifying tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in rodents. *Exp Toxicol Pathol.* 2017; 69(8): 637-42.
- 36) Kanie S, Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Yoshida S, Hashimoto N, Imaida K. Suppressive effects of the expectorant drug ambroxol hydrochloride on quartz-induced lung inflammation in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2017; 30(2): 153-59.
2. 学会発表
- 1) 鰐淵英機, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 奥野高裕. 環境化学物質による発がん細胞傷害・修復の破綻. 第 107 回日本病理学会総会、北海道 (2018 年 6 月)(ワークショップ)
- 2) 梯アンナ, 石井真美, 奥野高裕, 魏民, 鰐淵英機. 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の肝細胞と肝がんにおけるプロテオーム解析. 第 107 回日本病理学会総会、北海道 (2018 年 6 月)
- 3) 奥野高裕, 石井真美, 梯アンナ, 魏民, 鰐淵英機. NASH 由来の肝細胞癌における mTOR の活性化. 第 107 回日本病理学会総会、北海道 (2018 年 6 月)
- 4) 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 奥野高裕, 鰐淵英機. 職業性胆管がんにおける疫学のおよび動物モデルでの知見. 第 25 回日本がん予防学会学術総会、香川 (2018 年 6 月)
- 5) 行松直, 奥野高裕, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 鰐淵英機. o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性の検討. 第 33 回発癌病理研究会、静岡 (2018 年 8 月)
- 6) 藤岡正喜, 魏民, 奥野高裕, 行松直, 大石裕司, 梯アンナ, 鰐淵英機. 有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid のマウス経胎盤ばく露による発がん機序の検討. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 7) 奥野高裕, 行松直, 藤岡正喜, 梯アンナ, 魏民, 鰐淵英機. Acetoaceto-o-toluidide はラット膀胱上皮細胞の増殖と DNA 傷害を誘発する. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 8) 梯アンナ, 石井真美, 奥野高裕, 藤岡正喜, 多胡善幸, 魏民, 鰐淵英機. メタボリックシンドロームモデル TSOD マウスにおける NASH 肝臓組織及び腫瘍のメタボローム解析. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 9) 魏民, 藤岡正喜, 奥野高裕, 行松直, 山口貴嗣, 梯アンナ, 鰐淵英機. ラットにおける 1,4-dioxane の変異原性と発がん性の定量的解析. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 10) 藤岡正喜, 魏民, 奥野高裕, 行松直, 大石裕司, 梯アンナ, 鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 日本毒性学会生体金属部会主催メタルバイオサイエンス研究会 2018、宮城 (2018 年 11 月)
- 11) 奥野高裕, 行松直, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 鰐淵英機. 職業性膀胱癌に関わるヒト膀胱癌の特徴と実験病理学的解析. 第 18 回分子予防環境医学研究会大会、愛知県 (2019 年 1 月)
- 12) 行松直, 奥野高裕, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 鰐淵英機. o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性、発がんプロモーション作用の検討. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 1 月)
- 13) 山口貴嗣, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸の F344 ラットにおける慢性毒性試験及び発がん性試験. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 1 月)
- 14) 魏民, 藤岡正喜, 行松直, 奥野高裕, 山口貴嗣, 梯アンナ, 鰐淵英機. BBN 誘発マウス膀胱がんモデルにおける Acetazolamide の予防効果の検討. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 2 月)
- 15) 梯アンナ, 石井真美, 奥野高裕, 多胡善幸, 藤岡正喜, 魏民, 鰐淵英機. NASH モデル TSOD マウスにおける肝臓腫瘍および肝臓組織のメタボローム解析. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 2 月)
- 16) 藤岡正喜, 魏民, 奥野高裕, 行松直, 梯アンナ, 大石裕司, 鰐淵英機. 有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の経胎盤ばく露によるマウス肺発がん過程におけるヒストン修飾異常. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 2 月)
- 17) 野村祐介, 藤澤彩乃, 松下幸平, 豊田武士, 福井千恵, 森下裕貴, 小川久美子, 鄭雄一, 中村義一, 靄島由二. RNA アプタマーを利用した機能性医療材料開発. 日本薬学会第 139 年会、千葉 (2019 年 3 月)
- 18) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Effects of N-acetyl-L-cysteine on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice.

- 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore (2019.3)
- 19) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子．膀胱発がん物質投与初期における遺伝子発現解析および新規膀胱発がんマーカーの探索．第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、2019年2月1日
 - 20) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子．膀胱発がん物質投与初期における遺伝子発現解析および新規膀胱発がんマーカーの探索．第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2019年2月）
 - 21) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子．1,3-Dichloro-2-propanol のF344ラットを用いた28日間反復強制経口投与による毒性プロファイルの検索．第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2019年2月）
 - 22) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子．膀胱発がん物質投与による-H2AX形成の用量相関性及び経時的変化．第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2019年2月）
 - 23) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子．C57BL/6J野生型およびPol欠損マウスにおけるベンゾ[a]ピレンおよび-Naftofラボン併用投与の効果．第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2019年1月）
 - 24) 曹永晩、水田保子、赤木純一、豊田武士、井手鉄哉、小川久美子．腹腔内投与銀ナノ粒子によるBALB/cマウスの急性毒性における抗酸化剤の影響．第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2019年1月）
 - 25) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Metabolomics and DNA adductome analysis of urinary bladder carcinogen *o*-toluidine. The 23rd Shizuoka Forum on Health and Longevity, Shizuoka (2018.11)
 - 26) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Metabolomics and DNA adductome analysis of urinary bladder carcinogen *o*-toluidine. The 4th International Conference on Pharma-food General Information, Shizuoka (2018.11)
 - 27) Akagi J, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Yokoi M, Hanaoka F, Ohmori H, Ogawa K. Benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis in Pol⁻knockout mice. 3R&3C Symposium, Kanazawa (2018.11)
 - 28) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、中村義一、齋島由二．RNAアプタマーを用いた新規骨再生用材料のin vivo性能評価．第40回日本バイオマテリアル学会大会、神戸（2018年11月）
 - 29) 野村幸世、豊田武士、菅原寧彦．胃癌バイオマーカーとしての血清 TFF3 の起源とその上昇機序の解明．第22回日本肝臓学会大会、神戸（2018年11月）
 - 30) 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．日本環境変異原学会第47回大会、京都（2018年11月）
 - 31) 降旗千恵、豊田武士、小川久美子、鈴木孝昌．RNA-Seqによる1,4-ジオキサン(D0)のラット肝臓における遺伝子発現プロファイル：遺伝毒性および非遺伝毒性肝発がん物質との比較．日本環境変異原学会第47回大会、京都（2018年11月）
 - 32) 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）
 - 33) 山田貴宣、豊田武士、小川久美子．幹細胞マーカー免疫染色による膀胱発がん物質の早期検出．第77回日本癌学会学術総会、大阪（2018年9月）
 - 34) 保田智彦、吉田寛、内田英二、豊田武士、瀬戸泰之、野村幸世．MEK阻害剤によるヘリコバクター・ピロリ菌感染スナネズミ胃粘膜の回復．第77回日本癌学会学術総会、大阪（2018年9月）
 - 35) 保田智彦、Qing Yang、豊田武士、Eunyoung Choi、内田英二、吉田寛、瀬戸泰之、James R. Goldenring、野村幸世．MEK阻害剤 Selumetinib による *H. pylori* 感染スナネズミ胃粘膜における化生粘膜の回復．第27回消化器疾患病態治療研究会、高知（2018年9月）
 - 36) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Tamehiro N, Kimura Y, Adachi R, Ogawa K. Dose-dependent sensitization effects of transcutaneously exposed acid-hydrolyzed wheat protein. 16th European Congress of Toxicologic Pathology, Brussels (2018.9)
 - 37) 豊田武士、山田貴宣、鈴木周五、松下幸平、曹永晩、赤木純一、森川朋美、水田保子、西川秋佳、小川久美子．-H2AXを指標とした化学物質の膀胱発がん性早期検出系の開発．第33回発癌病理研究会、御殿場（2018年8月）
 - 38) 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回発癌病理研究会、御殿場（2018年8月）
 - 39) 豊田武士、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、小川久美子．膀胱発がん性芳香族アミンの短期投与によるラット膀胱粘膜遺伝子発現動態への影響．第45回日本毒性学会学術年会、大阪（2018年7月）
 - 40) 曹永晩、赤木純一、水田保子、豊田武士、小川久美子．コレラトキシン及びコレラトキシンBサブユニットの経皮曝露感作性試験におけるアジュバントとしての可能性．第45回日本毒性学会学術年会、大阪（2018年7月）
 - 41) 山田貴宣、豊田武士、曾根瑞季、鈴木周五、松下

- 幸平、森川朋美、小川久美子 . -H2AX を指標とした膀胱発がん性の早期予測 - 追加の化学物質による検証 - . 第 45 回日本毒性学会学術年会、大阪 (2018 年 7 月)
- 42) 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 . がん予防学術大会 2018 高松、高松 (2018 年 6 月)
- 43) Nomura S, Yasuda T, Yang Q, Toyoda T, Choi E, Uchida E, Seto Y, Goldenring JR. Amelioration of metaplasia and re-emergence of normal gastric lineages after treatment of *H. pylori* infected gerbils with a MEK inhibitor. Digestive Disease Week 2018, Washington (2018.6)
- 44) 森川朋美、松下幸平、豊田武士、山田貴宣、高橋美和、井上薫、小川久美子 . ラットを用いた 2-エチルブタナールの 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験 . 日本食品化学学会第 24 回総会・学術大会、東京 (2018 年 5 月)
- 45) 野村幸世、豊田武士、大津洋、石橋祐子、愛甲丞、長田梨比人、市田晃彦、菅原寧彦、國土典弘、瀬戸泰之 . 胃癌、膵癌、乳癌早期発見バイオマーカーとしての血清 TFF3 とその起源の解明 . 第 118 回日本外科学会定期学術集会、東京 (2018 年 4 月)
- 46) 鈴木周五、他、ラット膀胱発がんに対するニコチンの影響、第 107 回日本病理学会総会、2017 年 6 月、札幌 .
- 47) 鈴木周五、他、ラット膀胱発がんに対するニコチンの影響、第 77 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月、大阪 .
- 48) 鈴木周五、他、ラット膀胱発がんに対するニコチンの影響、第 35 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2019 年 1 月、東京 .
- 49) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、ファインチューニングした Deep Convolutional Neural Networks によるヒト肺癌細胞像の自動分類 . 第 107 回日本病理学会総会、札幌 (2018 年 6 月)
- 50) 横平政直、肺胞サーファクタントの役割と発癌リスク評価への応用 (The Role of Surfactant proteins and the Application for Assessment of the risk of Carcinogenesis) 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、日本毒性病理学会、沖縄、2018.01
- 51) 横平政直、肺過形成性病変の発癌リスク評価における napsin A の発現と予防作用検出の試み、がん予防学術大会 2018 高松、がん予防学会、2018.06
- 52) 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)
- 53) 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)
- 54) 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)
- 55) 齋藤春五、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)
- 56) 高橋沙奈衣、齋藤春五、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊: Fe³O₄ 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)
- 57) 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)
- 58) 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)
- 59) 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)
- 60) 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)
- 61) 齋藤春吾、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)
- 62) 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)

G. 知的所有権の取得状況

1 . 特許取得

該当なし

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

該当なし