

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）  
OECD プログラムにおいて TG と DA を開発するための AOP に関する研究

平成30年度 分担研究報告書

発がん性試験のTGおよび発がん性AOP開発

研究分担者 小川 久美子

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 病理部長

研究分担者 西川 秋佳

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 客員研究員

**研究要旨**

毎年、国内外で多くの新規化学物質が考案され、我々の日常生活に応用されている。一方、化学物質の発がん性評価は 1 群雌雄 50 匹で 3 用量及び対照群を設けたげっ歯類を用いた 2 年間反復投与試験がスタンダードとされており、時間的、コスト的およびヒトへの外挿性の観点からも、その実施は限定的となっている。本研究では、より効率的な発がん性試験法の TG 開発及び発がん機序に基づく発がん性評価法の基礎となる AOP の開発を主な目的とするとともに、現在 OECD で作成が進められている非遺伝毒性発がん性の IATA 作成に对面会議や電話会議を通じて発がんの専門家としての協力が求められる。

1990～2000 年代に名古屋市立大学のグループで開発され、既に厚生労働省の化学物質発がん性スクリーニングに採用されているラット肝中期発がん性試験の TG 申請を行うため、文献資料を整理し作成した SPSF (Standard Project Submission Form) を OECD に提案した。また、2013 年から 2017 年に厚労省の依頼によって 3 つの施設で実施された合計 26 (それぞれ 10, 8, 8 試験) の試験結果について、溶媒を投与した陰性対照群及びフェノバルビタールを投与した陽性対照群のデータを比較検討し、本法の再現性などを検討したところ、何れの施設においてもデータは安定しており、陽性対照群は有意差をもって検出されていることが確認された。さらに日本製薬工業会グループ (研究協力者久田茂博士ほか) の協力を得て、医薬品のラットにおける非遺伝毒性発がん性 AOP に関する SPSF を OECD に提案した。また、非遺伝毒性発がん機序の一つである細胞障害を key event とする鼻腔発がんの AOP を OECD に提出中であるが、今年度はその起始分子イベントを検討した。その結果、酸化的ストレスが候補として浮上したため、それを起始イベントとして AOP 作成を継続する。同時に、これまで検討してきた鼻腔発がんの病理発生に係る情報を整理し、論文投稿を目指す。

ラット肝中期発がん性試験及びラットにおける非遺伝毒性発がん性 AOP に関する SPSF に対して、OECD 加盟各国からコメントが得られた。これらに対応した SPSF の改訂版を提出し、今後、TG 化あるいはガイダンスドキュメント作成及び AOP の作成を進める予定である。また、非遺伝毒性発がん性の IATA 作成について、2018 年 6 月に OECD にて開催

された非遺伝毒性発がん性IATA作成専門家会議に出席し、討議に参画した。非遺伝毒性発がん性に係る試験・検査のパラメータを優先順位別に4つのカテゴリーに分けること、候補となる試験・検査法を13のブロックに分け、分担してレビューすることに合意した。

## A. 研究目的

毎年、国内外で多くの新規化学物質が考案され、我々の日常生活に応用されている。一方、化学物質の発がん性評価は1群雌雄50匹で3用量及び対照群を設けたげっ歯類を用いた2年間反復投与試験がスタンダードとされており、時間的、コスト的およびヒトへの外挿性の観点からも、その実施は限定的となっている。さらに、動物実験の3Rsに対する国際動向に呼応し、動物実験からヒト材料を用いた *in vitro* 試験、あるいは毒性作用機構に基づく安全性評価手法の開発が進められている。OECDにおいても、反復投与毒性、生殖発生毒性、感作性、発がん性などの毒性発現機構を明確にするためにAOP (Adverse Outcome Pathway) を作成し、それらの情報を網羅した IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) により化学物質の行政的な安全性評価を推進する戦略を進めている。本研究では、より効率的な発がん性試験法の TG 開発及び発がん機序に基づく発がん性評価法の基礎となる AOP の開発を目的とするとともに、現在 OECD で作成が進められている非遺伝毒性発がん性の IATA 作成に対面会議や電話会議を通じて発がんの専門家としての協力が求められる。

## B. 研究方法

### B.1. 発がん性試験の TG 開発 (小川)

1990~2000年代に小川が在籍していた名古屋市立大学のグループで開発され、既に

厚生労働省の化学物質発がん性スクリーニングに採用されているラット肝中期発がん性試験の TG 申請を行うため、文献資料を整理し作成した SPSF (Standard Project Submission Form) を OECD に提案する。また、2013年から2017年に厚労省の依頼によって3つの施設で実施された合計26(それぞれ10, 8, 8試験)の試験結果について、溶媒を投与した陰性対照群及びフェノバルビタールを投与した陽性対照群のデータを比較検討し、本法の再現性などを検討する。

### B.2. 発がん性の AOP 開発 (西川・小川)

- (1) 日本製薬工業会グループ(久田茂ほか)の協力を得て、ラットにおける非遺伝毒性発がん性 AOP にかんする SPSF を OECD に提案する。
- (2) 研究分担者の西川および小川は、ラット、マウスおよびハムスターに鼻腔腫瘍を誘発した化学物質に関する文献を PubMed および NTP のデータベースを用いて網羅的に検索し、鼻腔腫瘍の組織型と非巢陽性病変、投与経路並びに遺伝毒性との関連性について、さらに解析を進めた。OECD に AOP 案を提出した際に発がんの起始分子イベントを細胞障害としてよいとの回答を得ているが、さらに適切な分子イベントがないか検索する。

### B.3. 非遺伝毒性発がん性の IATA 作成への協力 (西川・小川)

2018年6月24日～29日にOECDにて開催された非遺伝毒性発がん性IATA作成専門家会議に出席し、討議に参画した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験の3Rsに配慮して試験法の開発を主とするものであり、実験動物、ボランティアおよびヒト組織は使用しないことから、倫理的問題は無いと考える。

## C. 研究結果

### C.1. 発がん性試験のTG開発 (小川)

ラット肝中期発がん性試験のTG申請を行うために、関連論文等の資料を整理してSPSFを作成し、厚労省を介してOECDに提案した。SPSF提案に対するOECD加盟各国からのコメントに対応した回答集及びSPSFの改訂版を作成しOECDに提出した。

2013年から2017年に3つの施設で実施された26の試験結果については、何れの施設においてもデータは安定しており、陽性対照群は有意差をもって検出されていることが確認された。

### C.2. 発がん性のAOP開発 (西川・小川)

(1) ラットにおける非遺伝毒性発がん性AOPのSPSFを13件作成し、研究代表者(小島)を介してOECDに提案した。12月のEAGMST会議において議論された。最も大きなコメントは、そのAOPの全てがげっ歯類に特異的な経路であって、ヒトに外挿できないのであれば、AOPには馴染まないという意見であった。いずれもヒトでの発がん性は低いと考えられるが、外挿できないとまでは

言えない点を強調して、SPSFの改訂をおこないOECDに提出した。

(2) 網羅的に情報収集した鼻腔発がん物質(ラット41物質、マウス5物質、ハムスター7物質)によって誘発された鼻腔腫瘍をINHANDに基づいて分類した結果、10種類の腫瘍性病変(扁平上乳頭腫・癌、腺腫・腺癌、腺扁平上皮癌、神経上皮癌、軟部肉腫等)に分類されたが、鼻腔腫瘍と先行病変と考えられる非腫瘍性病変との関連は癌であっても腫瘍毎に異なる傾向が見られた。AOP作成のため、鼻腔粘膜の細胞障害を引き起こす起始分子イベントを検索したところ、酸化ストレスに関連する文献が比較的多く見つかったことから、今後はその方向で作成を進める。同時に、これまでの病理学的検討は鼻腔発がんの病理発生解明に大きく寄与するはずであり、別途論文文化を目指して準備をしている。

### C.3. 非遺伝毒性発がん性のIATA作成への協力 (西川・小川)

OECDで進められている非遺伝毒性発がん性のIATA策定に協力した。6月の会議において、非遺伝毒性発がん性に係る試験・検査のパラメータを優先順位に関して4つのカテゴリーに分けることにした。また、候補となる試験・検査法を13のブロックに分けて、分担してレビューすることになった(添付資料参照)。

## D. 考察

### D.1. 発がん性試験のTG開発 (小川)

ラット肝中期発がん性試験のTG申請を目差してSPSFを申請した。提案をサポート

トしないとのコメントに対しては、文献を用いて説明を追加して改訂版の SPSF を作成した。4 月の WNT 会合においても、本試験法の意義について説明をおこない TG 化あるいはガイダンスドキュメント作成を目差す。

#### D.2. 発がん性の AOP 開発 (西川・小川)

(1) OECD に提案した 13 件のラットにおける非遺伝毒性発がん性 AOP の SPSF に沿って、順次、AOP 案を作成する。ラット特異的か、あるいはヒトへの外挿性も考慮すべきか慎重に取りまとめる必要がある。

(2) 細胞毒性を初動因子とした鼻腔発がんの AOP 開発を OECD に申請済みであり、細胞傷害と腫瘍発生との関連に係るデータ解析を進めたところ、他の細胞毒性を初動因子とした AOP の成立が少ないことを鑑み、酸化的ストレスを起始分子イベントとする AOP 作成を進めると同時に、鼻腔発がんの病理発生にかかる論文化を目指す。

#### D.3. 非遺伝毒性発がん性の IATA 作成への協力 (西川・小川)

非遺伝毒性発がん性の IATA 作成については、可能な限り協力を続ける。

### E. 結論

#### E.1. 発がん性試験の TG 開発 (小川)

ラット肝中期発がん性試験の TG 化を目指して SPSF を作成し OECD に提出した。得られたコメントに対して回答集及び改訂版を作成し再提出した。

#### E.2. 発がん性の AOP 開発 (西川・小川)

(1) ラットにおける非遺伝毒性発がん性

AOP の SPSF を 13 件作成し、OECD に提案した。得られたコメントに対して改訂版を作成し再提出した。今後ヒトへの外挿性を考慮して順次 AOP を作成する。

(2) 細胞毒性を初動因子とした鼻腔発がんの AOP 開発に関して検討し、今後、論文化を進める。

#### E.3. 非遺伝毒性発がん性の IATA 作成への協力 (西川・小川)

非遺伝毒性発がん性の IATA 作成を継続した。

### F. 研究発表

#### F.1. 論文発表

1. Kawai A, Goto T, Shibata T, Tani K, Mizutani S, Nishikawa A, Shibata T, Matsumoto S, Nagata K, Narukawa M, Matsui S, Ando M, Toguchida J, Monden M, Heike T, Kimura S, Ueda R. Current state of therapeutic development for rare cancers in Japan, and proposals for improvement. *Cancer Sci.* 2018 May;109(5):1731-1737. doi: 10.1111/cas.13568.
2. Toyoda T, Cho YM, Akagi JI, 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(7):423-433. doi: 10.2131/jts.43.423.
3. Tsuchiya T, Kijima A, Ishii Y, Takasu S, Yokoo Y, Nishikawa A, Yanai T, Umemura T. Role of oxidative stress in the chemical structure-related genotoxicity of nitrofurantoin in Nrf2-deficient gpt delta mice. *J Toxicol Pathol.* 2018 Jul;31(3):169-178. doi: 10.1293/tox.2018-0014.
4. Tsuchiya T, Kijima A, Ishii Y, Takasu S,

- Yokoo Y, Nishikawa A, Yanai T, Umemura T. Mechanisms of oxidative stress-induced in vivo mutagenicity by potassium bromate and nitrofurantoin. J Toxicol Pathol. 2018 Jul;31(3):179-188. doi: 10.1293/tox.2018-0024.
5. Sone M, Toyoda T, Cho YM, Akagi JI, Matsushita K, Mizuta Y, Morikawa T, Nishikawa A, Ogawa K. Immunohistochemistry of  $\gamma$ -H2AX as a method of early detection of urinary bladder carcinogenicity in mice. J Appl Toxicol. 2019 Jan 31. doi: 10.1002/jat.3775.
6. 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 Toxicol, 93:753-762, 2019.

## F.2. 学会発表

本課題に直接関連する学会発表はありません。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### G.1. 特許取得

該当なし

### G.2. 実用新案登録

該当なし

### G.3. その他

該当なし