

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究研究事業

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

平成29年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鰐淵 英機

平成30(2018)年 5月

目 次

I . 総括研究報告	
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	1
鰐淵英機	
II . 分担研究報告	
1 . 病理組織発がんマーカーを用いた中期発がんリスク評価法の確立： 膀胱発がん物質の評価	7
豊田武士	
2 . 病理組織発がんマーカーを用いた中期発がんリスク評価法の確立： 膀胱発がん物質の評価	10
鈴木周五	
3 . 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： 肝発がん物質の評価	12
魏 民	
4 . 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： 肝発がん物質の評価	15
横平政直	
5 . 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： 肝発がん物質の評価	23
塚本徹哉	
6 . 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： 肝発がん物質の評価	25
鰐淵英機	
7 . 網羅的なDNA付加体解析法を用いた化学物質のDNA損傷性評価： 肝発がん物質の評価	28
戸塚ゆ加里	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	32

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 29 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的とし、-H2AX を用いた短期膀胱発がんリスク評価法の確立およ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。-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 10 種類について、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 -H2AX 形成を免疫組織化学的に検討した結果、10 物質中 9 物質で有意に増加した。一方で、Ki67 発現の有意な増加は 10 物質中 7 物質で認められた。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を含めた種々の化学物質 30 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、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いて肝発がん性を予測した。その結果、全ての遺伝毒性肝発がん物質（9 物質）について陽性判定が得られ（感度 100%）、その他の 21 物質中 19 物質で陰性判定が得られた（特異度 90.5%）。さらに、網羅的な DNA 付加体解析法を用いた化学物質の DNA 損傷性評価では、遺伝毒性肝発がん物質 4 種類と遺伝毒性陰性の非発がん物質 7 種類を投与したラット肝臓における DNA 付加体を網羅的に解析した結果、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性非発がん物質の 3 つのグループに分離できた。以上の結果から、-H2AX の膀胱発がん性早期検出マーカーとして有用性が示唆された。また、本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。

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 名古屋市立大学病理学 講師
塚本徹哉 藤田保健衛生大学 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
魏 民 大阪市立大学 分子病理学 准教授
戸塚ゆ加里 国立がん研究センター研究所
ユニット長

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。第二に、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。第三に、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。

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・安心を保障する重要な基盤となる。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発展・高精度化し、高精度発がん評価モデルとして確立する。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最終目的として、6研究施設による協同体制にて下記に記す三つの研究を実施する。第一に、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

平成 29 年度は、膀胱発がん物質 10 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、-H2AX の膀胱発がん性早期検出指標としての有用性を検証した。また、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を確立するために、9 種類の遺伝毒性肝発がん物質及び 21 種類のそれ以外の化合物（非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の遺伝毒性および非遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性非発がん物質）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、藤田保健衛生大/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)

国立衛研担当分として、5種類の膀胱発がん物質：4-Amino-2-nitrophenol (ANP)、Disperse blue 1 (DB1)、*N*-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)、*N*-Ethyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (EHBN)、Cyclophosphamide monohydrate (CPA)を、6週齢の雄 F344 ラットに 28 日間投与した。

名古屋大担当分として、5種類の膀胱発がん物質：1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ)、

Phenacetin (PNC)、*N*-Nitrosodiphenylamine (NDPA)、Sodium *o*-phenylphenol (SOPP)、11-Aminoundecanoic acid (AUDA)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、0.25% ANP 混餌、0.5% DB1 混餌、0.2% DHPN 飲水、0.042% EHBN 飲水、2.5 mg/kg/day CPA 強制経口、1% ADBAQ 混餌、0.5% PNC 混餌、0.4% NDPA 混餌、2% SOP 混餌、1.5% AUDA 混餌投与した。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/Ki67 発現解析を実施した。

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 31 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・藤田保健衛生大・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。動物試験プロトコルは事前に共有・配布し、プロトコ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 × 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 Maste 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ような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で得られた遺伝毒性肝発がん物質 4 種類(2-Nitropropane, 2-NP; *o*-Aminoazotoluene (AAT); Dimethylnitrosamine, DMN; 4,4-Thiodianiline, TDA)と遺伝毒性陰性の非発がん物質 7 種類(Diazepam, DZP; Disulfiram, DSF; Phenytoin, PHE; Rotenone, ROT; Tolbutamide, TLB; Aspirin, ASA; Triamterene, TRI)を投与したラット肝臓よりゲノム DNA を抽出し、アダクトーム法のサンプルとした。DNA 分解酵素で消化したのちに LC-Q-ToFMS で解析し、化学物質の投与に相関する付加体群のスクリーニングを行った。得られた質量数から、DNA 損傷のより詳細な解析やスクリーニングされた付加体群の化学物質による差異について検討した。

(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、10 物質中 9 物質(DB1、DHPN、EHBN、CPA、ADBAQ、PNC、NDPA、SOPP 及び AUDA)で有意に増加した。ANP 投与群では、-H2AX 形成の増加はみられなかった。細胞増殖マーカーである Ki67 についても同様の検索を行った。その結果、DHPN、EHBN、CPA、SOPP、ADBAQ、PNC 及び AUDA 投与群において陽性細胞の割合が有意に増加した一方、ANP、DB1 及び NDPA 投与群では増加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(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)を「陰性」と判定する。その結果、全ての遺伝毒性肝発がん物質(9 物質)について陽性判定が得られ(感度 100%)、遺伝毒性陰性の非発がん物質

21 物質のうち、ethionamide と Monocrotaline を除く 19 物質で陰性判定が得られた（特異度 90.5%）。

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（4 物質）と遺伝毒性陰性の非発がん物質（7 物質）から得られたデータをそれぞれ別々に主成分解析した結果、両者ともコントロールと分離されてはいるものの、非遺伝毒性非肝発がん物質ではあまりコントロールとの距離が離れていないことから、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。DNA アダクトーム解析による遺伝毒性の予測に応用できる可能性が示唆された。

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(+) 肝発がん物質	2-Nitropropane (2-NP)(陽性対照物質)	240	Positive
	o-Aminoazotoluene (AAT)	500	Positive
	N-Nitrosodimethylamine (DMN)	10	Positive
	4,4'-Thiodianiline (TDA)	300	Positive
	Nitrosodibutylamine (DBA)	400	Positive
	N-Nitrosopyrrolidine (NPYR)	300	Positive
	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (DMAB)	500	Positive
	N-Nitrosodiethylamine (NDEA)	70	Positive
	N-Nitrosodiethanolamine (NDELA)	2000	Positive
	N-Nitrosoethylmethylamine (DEMA)	30	Positive
Ames(-) 臓器発がん性 (-)	Diazepam (DZP)	80	Negative
	Disulfiram (DSF)	170	Negative
	Phenytoin (PHE)	550	Negative
	Rotenone (ROT)	20	Negative
	Tolbutamide (TLB)	830	Negative
	Aspirin (ASA)	70	Negative
	Triamterene (TRI)	130	Negative
	Promethazine (PMZ)	190	Negative
	Sulindac (SUL)	90	Negative
	Tetracycline (TC)	270	Negative
	Ethionamide (ETH)	440	Positive
	Theophylline (TEO)	80	Negative
	Caffeine (CAF)	60	Negative
Chloramphenicol (CMP)	830	Negative	
非遺伝毒性肝 発がん物質	Monocrotaline (MCT)	20	Positive
	Phenobarbital (PB)	50	Negative
Ames(+) 肝以外の臓器 発がん性	Cyclophosphamide (CPA)	30	Negative
Ames(-) 肝以外の臓器	Nitrofurantoin (NFT)	200	Negative
	Phenacetin (PCT)	550	Negative
Ames(-) 肝以外の臓器	Indomethacin (IM)	1	Negative
	Phenylbutazone (PhB)	80	Negative

D. 考察

本研究で検討した 10 種の膀胱発がん物質のうち、ANP を除く 9 物質で有意に増加した。ANP による -H2AX 形成検出には、より高濃度あるいは長期間の投与が必要と考えられた。一方で、Ki67 発現の有意な増加は 10 物質中 7 物質で認められた。H2AX は Ki67 よりも感度が高い結果を示せた。平成 30 年度以降は、新たな膀胱発がん物質及び膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質を用いた検討を行うとともに、OECD テストガイドライン化に関して必要な対応を実施する予定である。

遺伝毒性肝発がん物質検出モデルの検証では、遺伝毒性陰性の非発がん物質 ethionamide が遺伝毒性物質として判定されたが、*in vitro* 遺伝毒性試験では毒性を引き起こす用量で遺伝毒性陽性であったと報告がある (Kirkland et. al., 2016)。今回の投与量は LD50

の 1/3 量という高い投与量であったため、ethionamide が遺伝毒性作用に関連する遺伝子の変動を惹起したと推測される。Monocrotaline は非遺伝毒性肝発がん物質であったが、陽性との判定であったため、今後更なる検討が必要と考えられた。その他の被験物質については誤りなく判定されており、本遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた判定方法は遺伝毒性発がん物質の検出に有用と期待される。

E. 結論

-H2AX の膀胱発がん性早期検出マーカーとして有用性が示唆された。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tachibana H, Gi M, Kato M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers. *Cancer Sci*, 108, 331-337, 2017.
- 2) Yamaguchi T, Gi M, Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp Toxicol Pathol*. 69, 1-7, 2017.
- 3) Ishii N, Gi M, Fujioka M, Yamano S, Okumura M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid exerts promotion effects on hepatobiliary carcinogenesis in a rat medium-term multiorgan carcinogenicity bioassay. *J Toxicol Pathol*. 30, 39-45, 2017.
- 4) Kakehashi A, Stefanov VE, Ishii N, Okuno T, Fujii H, Kawai K, Kawada N, Wanibuchi H. Proteome Characteristics of Non-Alcoholic Steatohepatitis Liver Tissue and Associated Hepatocellular Carcinomas. *Int J Mol Sci*. 18, 2017.
- 5) Doi K, Fujioka M, Sokuza Y, Ohnishi M, Gi M, Takeshita M, Kumada K, Kakehashi A, Wanibuchi H. Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis. *In Vivo*. 31, 187-197, 2017.
- 6) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Doi K, Okuno T, Kakehashi A, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 104 weeks. *J Toxicol Sci*. 42, 475-483, 2017.
- 7) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Fukushima S, Wanibuchi H. Progression of Hepatic Adenoma to Carcinoma in *Ogg1* Mutant Mice Induced by Phenobarbital. *Oxid Med Cell*

- Longev. 2017:8541064, 2017.
- 8) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. Enhanced Susceptibility of Ogg1 Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 18, pii: E1801, 2017.
 - 9) Akagi J, Yokoi M, Cho YM, Toyoda T, Ohmori H, Hanaoka F, Ogawa K. Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases β and γ to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening. *DNA Repair*, 61: 76-85, 2017.
 - 10) Takeshima H, Niwa T, Toyoda T, Wakabayashi M, Yamashita S, Ushijima T. The degree of methylation burden is determined by the exposure period to carcinogenic factors. *Cancer Sci*, 108: 316-21, 2017.
 - 11) 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.*, 69(8): 637-642, 2017.
 - 12) Tsukamoto T, Nakagawa M, Kiriyama Y, Toyoda T, Cao X. Prevention of gastric cancer: Eradication of *Helicobacter pylori* and beyond. *Int J Mol Sci*, 18: 1699, 2017.
 - 13) Tsukamoto, T, Nakagawa, M, Kiriyama, Y, Toyoda, T, Cao, X. Prevention of Gastric Cancer: Eradication of Helicobacter Pylori and Beyond. *Int J Mol Sci* 18, E1699, 2017.
 - 14) Tahara, S, Tahara, T, Tsukamoto, T, Horiguchi, N, Kawamura, T, Okubo, M, Ishizuka, T, Nagasaka, M, Nakagawa, Y, Shibata, T, Kuroda, M, Ohmiya, N. Morphologic characterization of residual DNA methylation in the gastric mucosa after Helicobacter pylori eradication. *Cancer Med* 6: 1730-1737, 2017.
 - 15) Fuji, S., Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Kato, H., Hayakawa, M., Yamashita, Y., Kuno, T., Takahashi, S.: The NADPH oxidase inhibitor apocynin suppresses preneoplastic liver foci of rats. *Toxicol Pathol*, (2017) 45:544-550.
 - 16) Kataoka, H., Miura, Y., Kawaguchi, M., Suzuki, S., Okamoto, Y., Ozeki, K., Shimura, T., Mizoshita, T., Kubota, E., Tanida, S., Takahashi, S., Asai, K., Joh, T.: Expression and subcellular localization of AT motif binding factor 1 in colon tumours. *Mol Med Rep*, (2017) 16:3095-3102.
 - 17) Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two nonharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology*, 2017, Nov 16.
 - 18) Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 2017, 32:455-462.
 - 19) Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y. Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin. *Genes Environ.*, 2017, 39:12.
 - 20) Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two nonharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *J Appl Toxicol*, 38: 537-43, 2018.
 - 21) Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Sone M, Ogawa K. Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol*, 31: 73-80, 2018.
 - 22) Hirata T, Cho YM, Suzuki I, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate mediates nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 activation by regulating reactive oxygen species production in human esophageal epithelial cells. *Food Chem Toxicol*, 111: 295-301, 2018.
 - 23) Suzuki, S., Cohen, S. M., Arnold, L. L., Kato, H., Fuji, S., Pennington, K. L., Nagayasu, Y., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., and Takahashi, S.: Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis. *Toxicology* (2018) 398-399:31-40.
 - 24) Ito, Y., Naiki-Ito, A., Kato, H., Suzuki, S., Kuno, T., Ishiguro, Y., Takahashi, S., and Uemura, H.: Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by the down-regulation of the androgen receptor. *Oncotarget* (2018) 9(17):13859-13869.
 - 25) Suzuki, S., Kato, H., Fuji, S., Kaiki, T., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., and Takahashi, S.: Early detection of prostate carcinogens by immunohistochemistry of HMGB2. *J. Toxicol. Sci.* (2018) in press.
 - 26) 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.
- 2.学会発表
- 1) 鰐淵英機. 実験的アプローチを用いたヒ素発がん性の証明とその機序の解明. 第106回日本病理学会総会、東京(2017年4月)

- 2) 鰐淵英機、魏 民、藤岡正喜、梯アンナ：ヒ素の発がんリスク評価．第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川（2017 年 7 月）
- 3) 藤岡正喜、魏 民、河内聡子、梯アンナ、鰐淵英機．1,2-ジクロロプロパンおよびジクロロメタン複合曝露によるマウス肝臓への影響．第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川（2017 年 7 月）
- 4) 奥野高裕、梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機．NASH モデルマウスを用いた肝細胞癌の発がんメカニズム解析．第 32 回発癌病理研究会、滋賀（2017 年 8 月）
- 5) 香山侑弘、魏 民、藤岡正喜、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機．BBN 誘発マウス膀胱がんにおける Ink4a/Arf の役割の検討．第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川（2017 年 9 月）
- 6) 魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、香山侑弘、熊田賢次、鰐淵英機．BBN 誘発マウス膀胱がんモデルにおける Acetazolamide の抑制効果の検討．第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川（2017 年 9 月）
- 7) 藤岡正喜、魏 民、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機．CD1 マウスにおけるジメチルアルシン酸(DMA)の胎児期ばく露による発がん性．第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川（2017 年 9 月）
- 8) 梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機．非アルコール性脂肪肝炎の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析．第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川（2017 年 9 月）
- 9) 鰐淵英機．芳香族アミンによる膀胱癌の臨床病理学的研究と AAOT の毒性、発がん性評価．第 45 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、山形（2017 年 10 月）
- 10) 藤岡正喜、魏 民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、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．第 23 回ヒ素シンポジウム、茨城（2017 年 12 月）
- 11) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子．ベンゾ[a]ピレン混餌投与によるマウス前胃腫瘍発生に対する Pol の寄与．第 40 回日本分子生物学会年会、神戸、2017 年 12 月 7 日
- 12) Tajima Y, Toyoda T, Matsushita K, Hashidume T, Wakabayashi K, Miyoshi N. Analysis of genotoxic activities of urinary bladder carcinogenic aromatic amines. 12th International Conference on Environmental Mutagens, Incheon, 2017.11.15
- 13) 降旗千恵、鈴木孝昌、豊田武士、小川久美子．次世代シーケンス-Targeted mRNA Sequencing によるトキシコゲノミクス指標遺伝子の検証．日本環境変異原学会第 46 回大会、東京、2017 年 11 月 7 日
- 14) 小川久美子、曹永晩、石井雄二、豊田武士．病理からみた遺伝毒性．日本環境変異原学会第 46 回大会、東京、2017 年 11 月 7 日
- 15) 豊田武士、三好規之、小川久美子．o-トルイジンおよび o-アニシジンはラット膀胱粘膜に H2AX 形成を誘導する．第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 29 日
- 16) 豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子．芳香族アミン投与ラット膀胱粘膜における H2AX 発現．第 44 回日本毒性学会学術年会、横浜、2017 年 7 月 12 日
- 17) 曹永晩、赤木純一、水田保子、豊田武士、小川久美子．サイズによって異なるナノ銀の急性毒性．第 44 回日本毒性学会学術年会、横浜、2017 年 7 月 12 日
- 18) 野村幸世、豊田武士、長田梨比人、市田晃彦、大津洋、石橋祐子、愛甲丞、菅原寧彦、國土典弘、瀬戸泰之．胃癌、膵癌早期発見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 26 回日本癌病態治療研究会、横浜、2017 年 6 月 2 日
- 19) 竹島秀幸、丹羽透、豊田武士、山下聡、牛島俊和．組織におけるエピゲノム傷害の程度は、発がん要因への曝露期間により決まる．第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会、東京、2017 年 5 月 23 日
- 20) 鈴木周五、他、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第 106 回日本病理学会総会、2017 年 4 月、東京．
- 21) 鈴木周五、他、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月、横浜．
- 22) 戸塚ゆ加里：DNA 付加体形成と突然変異誘発 第 44 回日本毒性学会（横浜 2017 年 7 月）
- 23) Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS (ノースカロライナ、2017 年 9 月)
- 24) Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis 第 76 回日本癌学会学術総会（横浜 2017 年 9 月）
- 25) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆：マウス正常上皮の 3 次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系 第 76 回日本癌学会学術総会（横浜 2017 年 9 月）
- 26) 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 46 回日本環境変異原学会（東京、2017 年 11 月）
- 27) 前迫裕也、善家 茜、アスマ エルザワハリ、古川英作、加藤 護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索 第 46 回日本環境変異原学会（東京、2017 年 11 月）
- 28) 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤 治、稲葉

- 一穂、戸塚ゆかり：モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
- 29) 神尾翔真、斎藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆかり：生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
- 30) Totsuka Y：Adductomics IWGT 2017（東京、2017年11月）
- 31) Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis ¹²th ICEM-⁵th ACEM（仁川、2017年11月）
- 32) Totsuka Y：Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017（つくば、2017年12月）
- 33) 魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機．遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の開発．第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄（2018年1月）
- 34) 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機．2つのNASHモデルマウスにおける病理組織学的所見の違い．第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄（2018年1月）
- 35) 藤岡正喜、魏 民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、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．第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄（2018年1月）
- 36) 梯アンナ、奥野高裕、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機．NASHの肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析．第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄（2018年1月）
- 37) 熊田賢次、奥野高裕、魏 民、藤岡正喜、行松 直、梯アンナ、鰐淵英機．O-Acetoacetoluidide(AAOT)の毒性影響の検討．第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄（2018年1月）
- 38) 熊田賢次、藤岡正喜、魏 民、大石裕司、奥野高裕、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．第17回分子予防環境医学研究会、三重（2018年2月）
- 39) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、横井雅幸、大森治夫、花岡文雄、小川久美子．ベンゾ[a]ピレン誘発発がんに対するPol の寄与の解析．日本薬学会第138年会、金沢、2018年3月26日
- 40) Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. -H2AX formation induced by the bladder-carcinogenic aromatic amines *o*-toluidine and *o*-anisidine in the urinary bladder of rats. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, 2018.3.13
- 41) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Adjuvant effects of transcutaneously exposed cholera toxin and its B sub-unit. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, 2018.3.12
- 42) 豊田武士、松下幸平、曹永晩、赤木純一、曾根瑞季、西川秋佳、小川久美子．-H2AX免疫染色による膀胱発がんリスク早期検出法の開発．第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018年1月25日
- 43) 曹永晩、水田保子、赤木純一、豊田武士、小川久美子．経皮曝露感作性試験におけるコレラトキシン及びコレラトキシンBサブユニットのアジュバント作用．第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018年1月26日
- 44) 山田貴宣、松下幸平、豊田武士、森川朋美、高橋美和、井上薫、小川久美子．ラットを用いたバニリンプロピレングリコールアセタール（バニリンPGA）の90日間亜慢性反復経口投与毒性試験．第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018年1月25日
- 45) 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、横平政直、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
- 46) 岡部麻子、桐山諭和、鈴木周五、櫻井浩平、高橋智、塚本徹哉、DNA二重鎖切断マーカー-H2AXを用いた胃発がん物質の短期同定、日本毒性病理学会、2018年1月（沖縄）
- 47) 鈴木周五、他、前立腺発がん物質の早期検出モデルの確立、第34回日本毒性病理学会総会および学術集会、2018年1月、沖縄。
- 48) 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）

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

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 29 年度分担研究報告書

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）
分担研究項目：病理組織発がんマーカーを用いた中期発がんリスク評価法の確立：膀胱発がん物質の評価

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

研究要旨

本研究では、膀胱を標的とする発がん物質による 28 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膀胱発がんリスク評価法の確立を目指す。平成 29 年度は、6 週齢の雄 F344 ラットに 4-Amino-2-nitrophenol (ANP), Disperse blue 1 (DB1), *N*-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN), *N*-Ethyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (EHBN), Cyclophosphamide monohydrate (CPA) を 28 日間経口投与し、投与終了時に膀胱を採材した。膀胱粘膜上皮細胞における -H2AX (DNA 損傷マーカー) 形成および Ki67 (細胞増殖関連因子) 発現を定量的に解析した結果、DB1、DHPN、EHBN および CPA 投与群では -H2AX 陽性細胞の有意な増加が、またこのうち DB1 を除く 3 群では Ki67 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、ANP 投与群では、-H2AX 形成および Ki67 発現の増加は観察されなかった。以上の結果から、検索した 5 種の膀胱発がん物質のうち 4 種は、28 日間の投与でラット膀胱粘膜に -H2AX 形成を誘導することが示され、-H2AX の膀胱発がん性早期検出指標としての有用性が示唆された。

A . 研究目的

本研究では、膀胱を標的とする発がん物質による 28 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膀胱発がんリスク評価法の確立を目指す。これまでに我々は、鋭敏な DNA 損傷マーカーとして知られる -H2AX 形成を指標として、遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出が可能であることを明らかにしてきた。本試験系は通常の 28 日間反復投与毒性試験の検体を用いて、免疫組織化学的手法を追加することで実施できる点を特色とし、化学物質の効率のかつ迅速なリスク評価に寄与し得ると考えられる。

平成 29 年度は、膀胱発がん物質 5 種類についてラットを用いた 28 日間反復投与試験を実施し、-H2AX の膀胱発がん性早期検出指標としての有用性を検証した。

B . 研究方法

5 種類の膀胱発がん物質：4-Amino-2-nitrophenol (ANP), Disperse blue 1 (DB1), *N*-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN), *N*-Ethyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (EHBN), Cyclophosphamide monohydrate (CPA) 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、0.25% ANP 混餌、0.5% DB1 混餌、0.2% DHPN 飲水、0.042% EHBN 飲水および 2.5 mg/kg/day CPA 強制経口投与に設定した。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作製し、免疫組織化学的手法により -H2AX 形成/Ki67 発現解析を実施した。膀胱

粘膜上皮における -H2AX および Ki67 陽性細胞を定量的に解析し、陽性率を対照群と比較した。また、-H2AX/Ki67 陽性細胞を、その局在に基づいて基底層 (basal layer) 中間層 (intermediate layer) 表層 (superficial layer) の三層に分類し、局在による標的性の差異について検討した。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C . 研究結果

膀胱上皮細胞における -H2AX 形成および Ki67 発現を免疫組織化学的に検索した。2000 個以上/匹の粘膜上皮細胞をカウントし、1000 個あたりの -H2AX 陽性細胞数を算出した結果、DB1、DHPN、EHBN および CPA 投与群では、対照群と比較して -H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた (図 1)。ANP 投与群では、-H2AX 形成の増加はみられなかった。

細胞増殖マーカーである Ki67 についても同様の検索を行った。その結果、DHPN、EHBN および CPA 投与群において陽性細胞の割合が有意に増加した一方、ANP および DB1 投与群では増加は認められなかった (図 2)。-H2AX または Ki67 の増加が認められた各群について、陽性細胞をその局在に基づいて三層に分類した (図 3)。その結果、いずれの群でも基底層に位置する細胞の割合が高いことが明らかとなった。

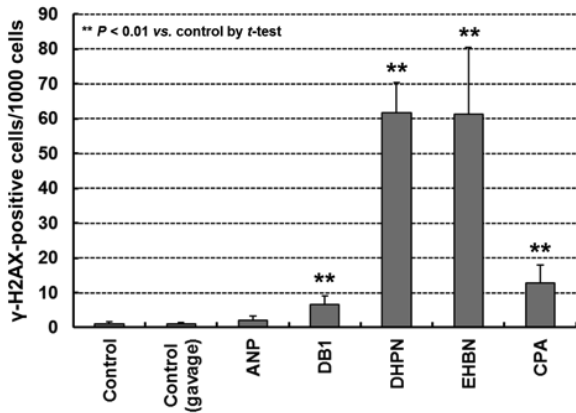


図 1. ラット膀胱粘膜上皮細胞における γ -H2AX 陽性細胞の定量解析。

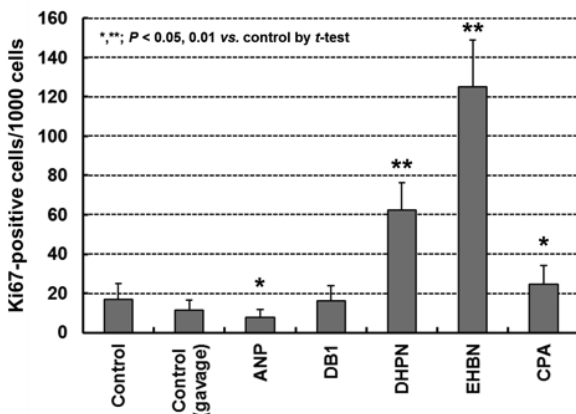


図 2. ラット膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析。

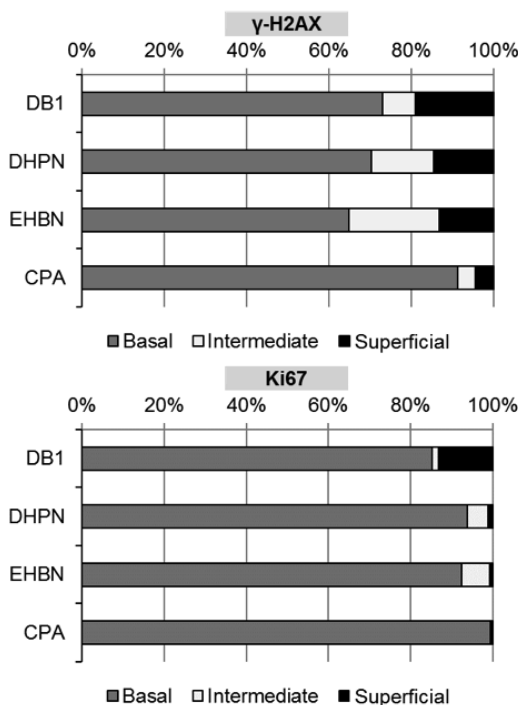


図 3. γ -H2AX および Ki67 陽性細胞の局在。基底層 (Basal)、中間層 (Intermediate)、表層 (Superficial)。

D. 考察

本研究で検討した5種の膀胱発がん物質のうち、DB1、DHPN、EHBN および CPA 投与群の膀胱には、 γ -H2AX 形成の有意な増加が認められ、このうち DB1 を除く3群では Ki67 発現も増加していた。一方、ANP 投与群ではいずれの増加も観察されなかった。ANP による γ -H2AX 形成の検出には、より高濃度あるいは長期間の投与が必要と考えられた。

今後、得られた結果について、他施設 (香川大・藤田保健衛生大・大阪市立大) でのバリデーションを行う予定である。平成 30 年度以降は、新たな膀胱発がん物質に加え、膀胱発がんプロモーター物質および膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質を用いた検討を行うとともに、OECD テストガイドライン化に関して必要な対応を実施する予定である。

E. 結論

本研究の結果から、検索した膀胱発がん物質 5 種のうち 4 種はラット膀胱粘膜における γ -H2AX 形成の有意な増加を引き起こし、膀胱発がん性早期検出マーカーとして有用であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Toyoda T**, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from *o*-toluidine and aniline. *J Appl Toxicol*, 38: 537-43, 2018
- 2) Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, **Toyoda T**, Sone M, Ogawa K. Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol*, 31: 73-80, 2018
- 3) Hirata T, Cho YM, Suzuki I, **Toyoda T**, Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate mediates nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 activation by regulating reactive oxygen species production in human esophageal epithelial cells. *Food Chem Toxicol*, 111: 295-301, 2018
- 4) Akagi J, Yokoi M, Cho YM, **Toyoda T**, Ohmori H, Hanaoka F, Ogawa K. Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases β and δ to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening. *DNA Repair*, 61: 76-85, 2017
- 5) Takeshima H, Niwa T, **Toyoda T**, Wakabayashi M, Yamashita S, Ushijima T. The degree of methylation burden is determined by the exposure period to carcinogenic factors. *Cancer Sci*, 108: 316-21, 2017
- 6) Tsukamoto T, Nakagawa M, Kiriya Y, **Toyoda T**, Cao X. Prevention of gastric cancer: Eradication

of *Helicobacter pylori* and beyond. *Int J Mol Sci*, 18: 1699, 2017

2. 学会発表

- 1) 赤木純一、曹永晩、**豊田武士**、水田保子、横井雅幸、大森治夫、花岡文雄、小川久美子．ベンゾ[a]ピレン誘発がんに対する Pol の寄与の解析．日本薬学会第 138 年会、金沢、2018 年 3 月 26 日
- 2) **Toyoda T**, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. -H2AX formation induced by the bladder-carcinogenic aromatic amines *o*-toluidine and *o*-anisidine in the urinary bladder of rats. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, 2018.3.13
- 3) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, **Toyoda T**, Ogawa K. Adjuvant effects of transcutaneously exposed cholera toxin and its B sub-unit. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, 2018.3.12
- 4) **豊田武士**、松下幸平、曹永晩、赤木純一、曾根瑞季、西川秋佳、小川久美子．-H2AX 免疫染色による膀胱発がんリスク早期検出法の開発．第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018 年 1 月 25 日
- 5) 曹永晩、水田保子、赤木純一、**豊田武士**、小川久美子．経皮曝露感作性試験におけるコレラトキシン及びコレラトキシン B サブユニットのアジュバント作用．第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018 年 1 月 26 日
- 6) 山田貴宣、松下幸平、**豊田武士**、森川朋美、高橋美和、井上薫、小川久美子．ラットを用いたバニリンプロピレングリコールアセタール (バニリン PGA) の 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験．第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018 年 1 月 25 日
- 7) 赤木純一、曹永晩、**豊田武士**、水田保子、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子．ベンゾ[a]ピレン混餌投与によるマウス前胃腫瘍発生に対する Pol の寄与．第 40 回日本分子生物学会年会、神戸、2017 年 12 月 7 日
- 8) Tajima Y, **Toyoda T**, Matsushita K, Hashidume T, Wakabayashi K, Miyoshi N. Analysis of genotoxic

activities of urinary bladder carcinogenic aromatic amines. 12th International Conference on Environmental Mutagens, Incheon, 2017.11.15

- 9) 降旗千恵、鈴木孝昌、**豊田武士**、小川久美子．次世代シーケンス-Targeted mRNA Sequencing によるトキシコゲノミクス指標遺伝子の検証．日本環境変異原学会第 46 回大会、東京、2017 年 11 月 7 日
- 10) 小川久美子、曹永晩、石井雄二、**豊田武士**．病理からみた遺伝毒性．日本環境変異原学会第 46 回大会、東京、2017 年 11 月 7 日
- 11) **豊田武士**、三好規之、小川久美子．*o*-トルイジンおよび *o*-アニシジンはラット膀胱粘膜に H2AX 形成を誘導する．第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 29 日
- 12) **豊田武士**、松下幸平、森川朋美、小川久美子．芳香族アミン投与ラット膀胱粘膜における H2AX 発現．第 44 回日本毒性学会学術年会、横浜、2017 年 7 月 12 日
- 13) 曹永晩、赤木純一、水田保子、**豊田武士**、小川久美子．サイズによって異なるナノ銀の急性毒性．第 44 回日本毒性学会学術年会、横浜、2017 年 7 月 12 日
- 14) 野村幸世、**豊田武士**、長田梨比人、市田晃彦、大津洋、石橋祐子、愛甲丞、菅原寧彦、國土典弘、瀬戸泰之．胃癌、膵癌早期発見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 26 回日本癌病態治療研究会、横浜、2017 年 6 月 2 日
- 15) 竹島秀幸、丹羽透、**豊田武士**、山下聡、牛島俊和．組織におけるエピゲノム傷害の程度は、発がん要因への曝露期間により決まる．第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会、東京、2017 年 5 月 23 日

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

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 29 年度分担研究報告書

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）
分担研究項目：病理組織発がんマーカーを用いた中期発がんリスク評価法の確立：膀胱発がん物質の評価

研究分担者 鈴木 周五 名古屋市立大学大学院・医学研究科・実験病態病理学 講師

研究要旨

本研究は、膀胱を標的とする発がん物質を早期に検出できる指標の探索を目的としている。現在まで DNA 二重鎖切断マーカーである H2AX が、遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として利用し得る可能性を示した。平成 29 年度は H2AX に関して、遺伝毒性物質のみではなく、膀胱発がん物質全てを検出できる可能性について、また、その検出法としての精度をより詳しく検討するため、既存の膀胱発がん物質 5 種類について、28 日間反復投与試験のプロトコールに基づいて検討した。対照群との比較検討において、遺伝毒性の有無に関わらず今回用いた膀胱発がん物質 5 種類いずれにおいても H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、Ki67 では、NDPA を除く 4 種類で陽性細胞の有意な増加が認められた。以上の結果から、化審法で実施される 28 日間反復投与試験のプロトコールに基づいて採取した膀胱において、遺伝毒性の有無に関わらず膀胱発がん物質を検出できる可能性を示した。

A．研究目的

近年、発がん過程における DNA 損傷・修復経路の重要性が明らかにされつつあり、特に DNA 二重鎖切断はゲノム不安定性の原因となる深刻な傷害と認識されている。DNA に二重鎖切断が生じると、ヒストン構成タンパクの一種である H2AX が速やかにリン酸化され、H2AX を形成する。H2AX は DNA 修復因子の結合標的となり、二重鎖切断修復に必須の役割を果たすことが知られている。H2AX は損傷部位から離れた領域まで広範囲に集積する特徴があり、特異抗体によって核内の小型点状巣として検出することが可能となっている。

以前の研究において、膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質について化審法で実施される 28 日間反復投与試験のプロトコールに基づいて採取した膀胱について検討した結果、遺伝毒性膀胱発がん物質を投与された膀胱尿路上皮において、H2AX 免疫染色による核陽性細胞が有意に上昇することが示され、遺伝毒性膀胱発がん物質を短期間（4 週間）の投与で検出し得る可能性が示唆された。

平成 29 年度は、この検出法が、遺伝毒性を有する発がん物質のみならず、膀胱を標的とする発がん物質全てについて検討可能であるか、また、その発がん物質検出精度について、ラットにおいて膀胱発がんを示す化学物質を 5 種類用いて検討した。

B．研究方法

6 週齢 F344 雄ラットに、1%
1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ)、
0.5% Phenacetin (PNC)、0.4%
N-Nitrosodiphenylamine (NDPA)、2% Sodium
o-phenylphenol (SOPP)、1.5%
11-Aminoundecanoic acid (AUDA) を混餌投与し、4
週間後に屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。

肝臓を分担研究者に要望された状態（凍結）で送付した。膀胱組織について免疫組織染色を行い、 γ H2AX および Ki67 の標識率を検討した。

倫理面への配慮

倫理面の配慮については、名古屋市立大学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

試験期間中、ADBAQ、SOPP および AUDA 投与群において対照群に比べ、体重増加抑制傾向を認め、屠殺・剖検時の体重は、上記 3 つの化学物質投与群で有意に抑制された。

膀胱組織学的検討の結果、AUDA 投与群において 5 匹中 2 匹に simple hyperplasia を認めた。

膀胱粘膜上皮における γ H2AX 標識率は、いずれの投与群でも上昇傾向を示し、多群間比較検定では、対照群に比べ、AUDA のみ有意な上昇を示した。一方、各化学物質と対照群との一対一での比較を行った結果、いずれも有意な上昇を認めた（図 1）。

膀胱粘膜上皮における Ki67 標識率は、いずれの投与群でも上昇傾向を示し、多群間比較検定では、対照群に比べ、SOPP および AUDA で有意な上昇を示した。一方、各化学物質と対照群との一対一での比較を行った結果、NDPA 以外は、有意な上昇を認めた（図 2）。

図 1. 膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 陽性細胞の定量解析

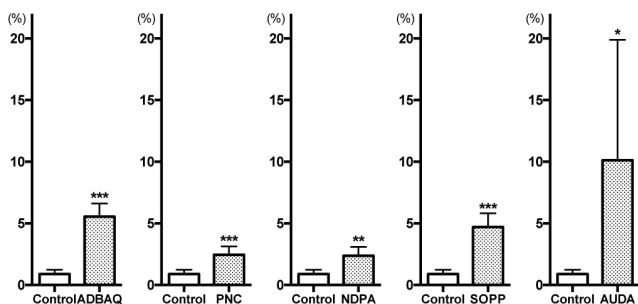
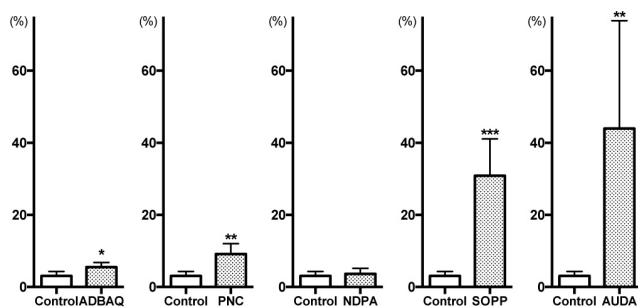


図2. 膀胱粘膜上皮細胞におけるKi67陽性細胞の定量解析



D. 考察

化審法で実施される28日間反復投与試験においては、各化学物質を対照群と比較検討すると考えるため、今回の膀胱発がん物質検出法を検討するに当たり、各化学物質と対照群との一対一での比較が重要と考えている。その結果、H2AXは今回検討した全ての膀胱発がん物質を検出できた。一方、Ki67は5つの化学物質のうちNDPAを除く4つの化学物質について検出できた。

E. 結論

化審法で実施される28日間反復投与試験において摘出した膀胱を用いて、H2AX免疫染色による標識率の検討は、膀胱発がん物質検出法として、有用であること可能性を示せた。また、Ki67よりも感度が高い結果を示せた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fuji, S., Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Kato, H., Hayakawa, M., Yamashita, Y., Kuno, T., Takahashi, S.: The NADPH oxidase inhibitor apocynin suppresses preneoplastic liver foci of rats. *Toxicol Pathol*, (2017) 45:544-550.

- 2) Kataoka, H., Miura, Y., Kawaguchi, M., Suzuki, S., Okamoto, Y., Ozeki, K., Shimura, T., Mizoshita, T., Kubota, E., Tanida, S., Takahashi, S., Asai, K., Joh, T.: Expression and subcellular localization of AT motif binding factor 1 in colon tumours. *Mol Med Rep*, (2017) 16:3095-3102.
- 3) Suzuki, S., Cohen, S. M., Arnold, L. L., Kato, H., Fuji, S., Pennington, K. L., Nagayasu, Y., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., and Takahashi, S.: Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis. *Toxicology* (2018) 398-399:31-40.
- 4) Ito, Y., Naiki-Ito, A., Kato, H., Suzuki, S., Kuno, T., Ishiguro, Y., Takahashi, S., and Uemura, H.: Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by the down-regulation of the androgen receptor. *Oncotarget* (2018) 9(17):13859-13869.
- 5) Suzuki, S., Kato, H., Fuji, S., Kaiki, T., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., and Takahashi, S.: Early detection of prostate carcinogens by immunohistochemistry of HMGB2. *J. Toxicol. Sci.* (2018) in press.

2. 学会発表

- 1) 鈴木周五、他、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第106回日本病理学会総会、2017年4月、東京。
- 2) 鈴木周五、他、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第76回日本癌学会学術総会、2017年9月、横浜。
- 3) 鈴木周五、他、前立腺発がん物質の早期検出モデルの確立、第34回日本毒性病理学会総会および学術集会、2018年1月、沖縄。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし

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 29 年度分担研究報告書

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）
分担研究項目：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

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 准教授

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的とし、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立および検証を行った。3種類の遺伝毒性肝発がん物質及び7種類の非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、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、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いて肝発がん性を予測した。その結果、全ての遺伝毒性肝発がん物質(3物質)について陽性判定が得られ、また、すべての非遺伝毒性非発がん物質で陰性判定が得られた。以上の結果から、本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。

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・安心を保障する重要な基盤となる。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発展・高精度化し、高精度発がん評価モデルとして確立する。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最終目的として、6研究施設による協同体制にて下記に記す三つの研究を実施する。第一に、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。第二に、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。第三に、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29年度は、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を確立するために、3種類の遺伝毒性肝発がん物質及び7種類の非遺伝毒性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。

B．研究方法

遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質10種類について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。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×0.5cmの大きさで2スライス切り出し、それぞれ1mLのRNAlater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 Maste 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。

（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

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（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）を「陰性」と判定する。その結果、全ての遺伝毒性肝発がん物質(3 物質)について陽性判定が得られ、遺伝毒性陰性の非発がん物質 7 物質すべてで陰性判定が得られた。

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(+) 肝発がん物質	2-Nitropropane (2-NP)(陽性対照物質)	240	Positive
	o-Aminoazotoluene (AAT)	500	Positive
	N-Nitrosodimethylamine (DMN)	10	Positive
	4,4'-Thiodianiline (TDA)	300	Positive
Ames(-) 臓器発がん性 (-)	Diazepam (DZP)	80	Negative
	Disulfiram (DSF)	170	Negative
	Phenytol (PHE)	550	Negative
	Rotenone (ROT)	20	Negative
	Tolbutamide (TLB)	830	Negative
	Aspirin (ASA)	70	Negative
	Triamterene (TRI)	130	Negative

D. 考察

すべての被験物質について誤りなく判定されており、本遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた判定方法は遺伝毒性発がん物質の検出に有用と期待される。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tachibana H, Gi M, Kato M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers. *Cancer Sci*, 108, 331-337, 2017.
- 2) Yamaguchi T, Gi M, Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp Toxicol*

Pathol. 69, 1-7, 2017.

- 3) Ishii N, Gi M, Fujioka M, Yamano S, Okumura M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid exerts promotion effects on hepatobiliary carcinogenesis in a rat medium-term multiorgan carcinogenicity bioassay. *J Toxicol Pathol.* 30, 39-45, 2017.
- 4) Doi K, Fujioka M, Sokuza Y, Ohnishi M, Gi M, Takeshita M, Kumada K, Kakehashi A, Wanibuchi H. Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis. *In Vivo.* 31, 187-197, 2017.
- 5) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Doi K, Okuno T, Kakehashi A, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 104 weeks. *J Toxicol Sci.* 42, 475-483, 2017.
- 6) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Fukushima S, Wanibuchi H. Progression of Hepatic Adenoma to Carcinoma in *Ogg1* Mutant Mice Induced by Phenobarbital. *Oxid Med Cell Longev.* 2017:8541064, 2017.
- 7) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. Enhanced Susceptibility of *Ogg1* Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 18, pii: E1801, 2017.

2. 学会発表

- 1) 鰐淵英機、魏 民、藤岡正喜、梯アンナ. ヒ素の発がんリスク評価. 第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2017 年 7 月)
- 2) 藤岡正喜、魏 民、河内聡子、梯アンナ、鰐淵英機. 1,2-ジクロロプロパンおよびジクロロメタン複合曝露によるマウス肝臓への影響. 第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2017 年 7 月)
- 3) 奥野高裕、梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機. NASH モデルマウスを用いた肝細胞癌の発がんメカニズム解析. 第 32 回発癌病理研究会、滋賀 (2017 年 8 月)
- 4) 香山侑弘、魏 民、藤岡正喜、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. BBN 誘発マウス膀胱がんにおける *Ink4a/Arf* の役割の検討. 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 5) 魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、香山侑弘、熊田賢次、鰐淵英機. BBN 誘発マウス膀胱発がんモデルにおける Acetazolamide の抑制効果の検討. 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 6) 藤岡正喜、魏 民、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. CD1 マウスにおけるジメチル

- アルシン酸(DMA)の胎児期ばく露による発がん性 . 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 7) 梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機 . 非アルコール性脂肪肝炎の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析 . 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 8) 藤岡正喜、魏 民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、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 . 第 23 回ヒ素シンポジウム、茨城 (2017 年 12 月)
- 9) 魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機 . 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の開発 . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 10) 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機 . 2 つの NASH モデルマウスにおける病理組織学的所見の違い . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 11) 藤岡正喜、魏 民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、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 . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 12) 梯アンナ、奥野高裕、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機 . NASH の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析 . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 13) 熊田賢次、奥野高裕、魏 民、藤岡正喜、行松直、梯アンナ、鰐淵英機 . 0-Acetoacetoluidide(AAOT)の毒性影響の検討 . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 14) 熊田賢次、藤岡正喜、魏 民、大石裕司、奥野高裕、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 . 第 17 回分子予防環境医学研究会、三重 (2018 年 2 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

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 29 年度分担研究報告書

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）
分担研究項目：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

研究分担者 横平 政直 香川大学 准教授

研究要旨

平成 29 年度年度は、TGP 由来ラット肝臓遺伝子発現データをもとに構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVM モデル）の検出力を検証するため、4 種の遺伝毒性肝発がん物質及び 7 種類の非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、24 時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。その結果、遺伝性発がん物質である 4 物質は遺伝性発がん物質と判定され、非遺伝性発がん物質のうち ethionamide 以外の 6 物質は非遺伝性発がん物質と判定された。ethionamide は高用量で遺伝毒性を発揮する報告がある。この遺伝子セットを用いた判定方法は遺伝毒性発がん物質の検出への有用性が確認された。

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および試験法をより一層精度化し、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研究を実施する。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。本研究の特色は化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に予測できる評価法及びヒトへの外挿に必要な発がんメカニズムに関する情報が得られる試験系を確立することにある。さらに、多施設協同研究で多数の化学物質を同時に評価することにより、評価法の標準化を推進し、国際動向を見据えた OECD テストガイドライン化を実現するのが本研究の独創的な点である。

平成 29 年度年度は、TGP 由来ラット肝臓遺伝子発現データをもとに構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVM モデル）の検出力を検証するため、4 種の遺伝毒性肝発がん物質及び 7 種類の非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、24 時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。

B．研究方法

日本チャールズブリバー社（神奈川県厚木）より購入した 4 週齢の SD ラット（雄性）について、2 週間の

馴化期間の後に実験を開始した。群構成は表 2 の通りで、体重測定を行い、各群の平均体重にばらつきがないよう群分けを行った。平成 29 年度で、遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の発がん物質 20 種類について、ラット単回投与試験（剖検は投与 24 時間後）を行い、得られた肝組織から遺伝子発現データを取得する。動物試験は 3 施設（担当：鰐淵/魏、塚本、横平）で行われたが、当施設では被験物質として、遺伝毒性肝発がん物質を 4 種類、非遺伝毒性肝発がん物質を 7 種類について検討した（表 1）。群構成が多くなったため、実験は 2 回に分けて行った（実験 1 および実験 2）。動物試験プロトコルは事前に共有・配布し、プロトコルに従い試験を実施した。遺伝子発現については、リアルタイム PCR でのデータを取得した実験開始時に、体重測定を行いながら体重当たりの投与量に調整した被験物質を各動物に強制胃内投与した。被験物質の投与濃度は表 3 の通りである。被験物質投与後 24 時間後に剖検を行った。剖検は、イソフルラン（abbvie #B506）吸入麻酔後、腹部大動脈から自然放血により安楽死させた。安楽死後、開腹し、臓器に肉眼的異常の有無を観察した。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×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、RNA 抽出用に採材した後の残りの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、ディープフリーザーにて凍結保管した（一本は DNA adduct 解析用）。ホルマリン固定用サンプルは、外側左葉の下半分、内側右葉(RM)および右葉尾部(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。

リアルタイム RT-PCR については施設共通のプロトコルに従って行った。具体的には、肝臓からの total RNA 抽出は RNeasy mini kit（キアゲン）を使用し、

3mm×3mm 程度の肝組織片から total RNA を抽出した。30uL の Rnase free H2O で溶出した。cDNA の合成は Super Script VI VIL0 Maste Mix(invitrogen) のキットを使用し、total RNA 1000 ng とした。逆転写反応は、total 20uL の volume で行った。サーマルサイクラーによる反応は、25 :10min、50 :10min、85 :5min、4 : とした。QPCR 用サンプルは「RT 反応液 (20ul)+ MilliQ 80 ul=100 ul」で調整した。TaqMan Fast Universal PCR Master Mixes (サーモフィッシャー)を使用し、リアルタイム PCR 反応をおこなった。

(倫理面への配慮)

いずれの動物実験も実験に先立ち、香川大学、動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、その許可を得た後に総合生命科学研究センター、同実験部門において香川大学動物実験規程に従って飼育管理した。

C. 研究結果

実験 1 では動物は全匹とも死亡例はなく、外見にも以上は認めなかった。実験 2 では外見に以上は認めなかったが、被験物質投与後 24 時間後に 2-Nitrosopropane 群の 1 匹、3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene の 3 匹の死亡が確認された。

肝臓の病理組織所見では、2-Nitrosopropane 群(実験 1 および実験 2)はうっ血、門脈域を中心とする炎症細胞浸潤(多形核白血球、リンパ球)を認めた。匹中 3 匹が死亡した 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene 群(9 群)は、肝組織に著変は見られなかった。その他の群では、陰性対照群とくらべて、わずかな炎症細胞浸潤～変化は乏しい印象であった。

リアルタイム RT-PCR の結果を代表研究者に送った。遺伝子発現データを構築済の肝発がん性予測モデル(サポートベクターマシーンによる数理的アルゴリズムによるモデル)に入力し、肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った(表 4)。その結果、非遺伝性発がん物質の ethionamide が遺伝性発がん物質として判定された。それ以外の被験物質については、遺伝性発がん物質である 4 物質は遺伝性発がん物質と判定され、非遺伝性発がん物質のうち ethionamide 以外の 6 物質は非遺伝性発がん物質と判定された。

D. 考察

今回、非遺伝性毒性発がん物質である ethionamide が遺伝性毒性物質として判定された。*in vitro* 遺伝毒性試験では毒性を引き起こす用量で遺伝毒性陽性があるという報告がある(Kirkland et. al., 2016)。今回の投与量は LD50 の 1/3 量という高い投与量であった。このため、ethionamide が遺伝毒性作用を発揮したと推測される。その他の被験物質については誤りなく判定されており、この遺伝子セットを用いた判定方法は遺伝性発がん物質の検出に有用と期待される。

E. 結論

今回、遺伝子セットを用いた判定方法により、遺伝性毒性発がん物質が正確に判定されており、この方法は遺伝性毒性発がん物質の検出に有用であることが確認された。

(F. 健康危険情報 なし)

G. 研究発表

1. 論文発表

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.*, 69(8): 637-642, 2017.

2. 学会発表

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、横平政直、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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 今回の検討で用いた被験物質についての情報

CAS. No			品番	
遺伝毒性肝発がん物質				
924-16-3	東京化成	Nitrosodibutylamine	N0375	N-ニトロソジブチルアミン 5ml
930-55-2	シグマアルドリッチ	N-Nitrosopyrrolidine (遮光)	158240-10G	1-Nitrosopyrrolidine 10g (遮光)
55-80-1	東京化成	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene ^s	M0207	4-(Dimethylamino)-3'-methylazobenzene 25g
79-46-9	東京化成	2-Nitrosopropane (2-NP)	N0249	2-Nitropropane 25g
非遺伝毒性非肝発がん物質				
60-87-7	和光純薬工業	Promethazine (PMZ)	160-11642	プロメタジン塩酸塩 25g
38194-50-2	和光純薬工業	Sulindac (SUL)	190-12701	スリンダク 10g
60-54-8	シグマアルドリッチ	Tetracycline (TC)	87128-25G	Tetracycline 25g
536-33-4	東京化成	Ethionamide (ETH)	E0695	エチオナミド 5g
58-55-9	和光純薬工業	Theophylline (TEO)	209-09932	テオフィリン 25g
58-08-2	和光純薬工業	Caffeine (CAF)	031-06792	カフェイン 25g
56-75-7	和光純薬工業	Chloramphenicol (CMP)	032-19451	クロラムフェニコール 5g
溶媒	和光純薬工業	0.5% Methyl cellulose (MC)	133-17815	メチルセルロース 500ml

表2 今回の実験における群構成

群構成			LD50 mg/kg (rat)	投与量(1/3 of LD50)
Group	被験物質			
1	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺伝毒性肝発がん物質 (陽性対照)	720	240
2	Nitrosodibutylamine (NB)	遺伝毒性肝発がん物質	1200	400
3	N-Nitrosopyrrolidine (遮光)(NNP)	遺伝毒性肝発がん物質	900	300
4	Promethazine (PMZ)	非遺伝毒性非肝発がん物質	580	190
5	Sulindac (SUL)	非遺伝毒性非肝発がん物質	264	90
6	Tetracycline (TC)	非遺伝毒性非肝発がん物質	807	270
7	0.5% Methyl cellulose (MC)	対照群		5ml/kg b.w.
8	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺伝毒性肝発がん物質 (陽性対照)	720	240
9	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (MDA)	遺伝毒性肝発がん物質	1500	500
10	Ethionamide (ETH)	非遺伝毒性非肝発がん物質	1320	440
11	Theophylline (TEO)	非遺伝毒性非肝発がん物質	225	80
12	Caffeine (CAF)	非遺伝毒性非肝発がん物質	192	60
13	Chloramphenicol (CMP)	非遺伝毒性非肝発がん物質	2500	830
14	0.5% Methyl cellulose (MC)	対照群		5ml/kg b.w.

表3 被験物質の投与量の調整

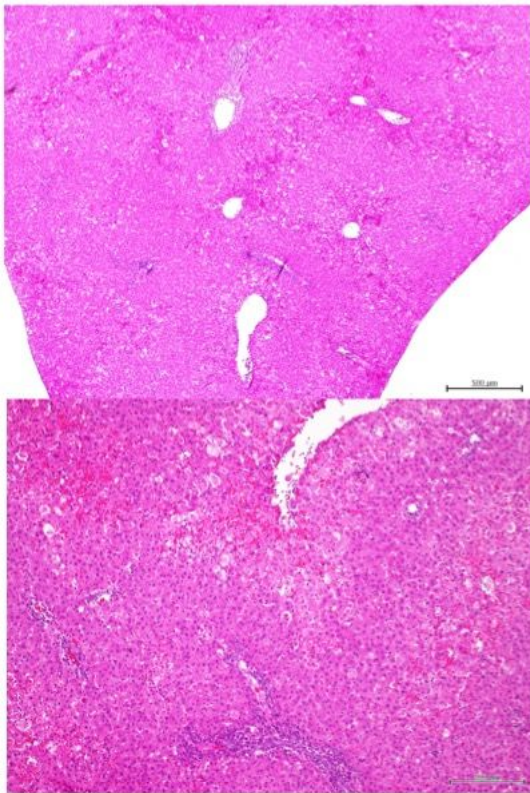
Group	被験物質		LD50 mg/kg (rat, oral)	投与量(1/3 of LD50) (mg/kg b.w)	被験物質質量 (mg)	Volume (5% MC, ml)	投与液濃度 (mg/5ml/kg b.w.)
1	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺肝発がん (陽性)	720	240	480	10	240
2	Nitrosodibutylamine	遺肝発がん	1200	400	800	10	400
3	N-Nitrosopyrrolidine (遮光)	遺肝発がん	900	300	600	10	300
4	Promethazine (PMZ)	非遺非肝発がん	580	190	380	10	190
5	Sulindac (SUL)	非遺非肝発がん	264	90	180	10	90
6	Tetracycline (TC)	非遺非肝発がん	807	270	540	10	270
7	0.5% Methyl cellulose (MC)	対照群		5ml	0	10	
8	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺肝発がん (陽性)	720	240	480	10	240
9	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene ^s	遺肝発がん	1500	500	1000	10	500
10	Ethionamide (ETH)	非遺非肝発がん	1320	440	880	10	440
11	Theophylline (TEO)	非遺非肝発がん	225	80	160	10	80
12	Caffeine (CAF)	非遺非肝発がん	192	60	120	10	60
13	Chloramphenicol (CMP)	非遺非肝発がん	2500	830	1660	10	830
14	0.5% Methyl cellulose (MC)	対照群		5ml	0	10	

表4 肝発がん性予測モデルの結果

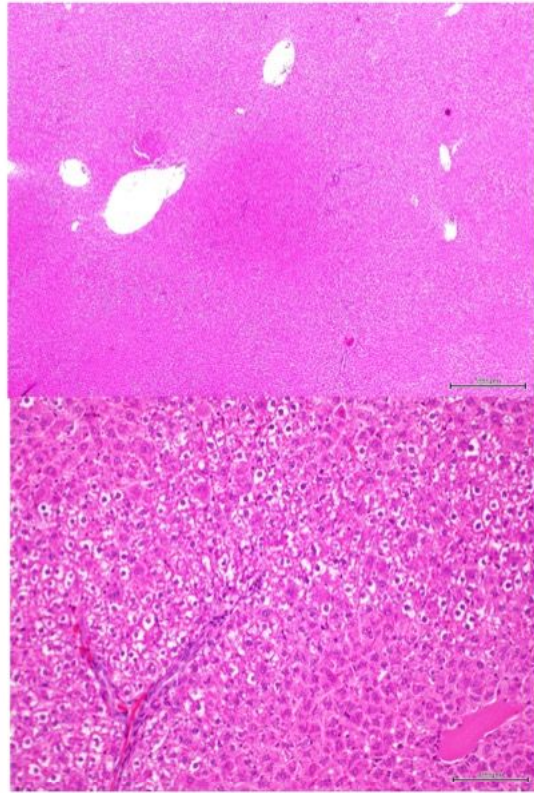
Chemicals	Predicted (Carcinogenicity)
2-Nitrosopropane (Ex 1)	[Positive]
Nitrosodibutylamine	[Positive]
N-nitrosopyrrolidine	[Positive]
Promethazine	[Negative]
Sulindac	[Negative]
Tetracycline	[Negative]
2-Nitrosopropane (Ex 2)	[Positive]
3-Methyl-4-dimethylaminoozobenzene	[Positive]
Ethionamide	[Positive]
Theophylline	[Negative]
Caffeine	[Negative]
Chloramphenicol	[Negative]

図1 肝臓の組織所見（実験1）

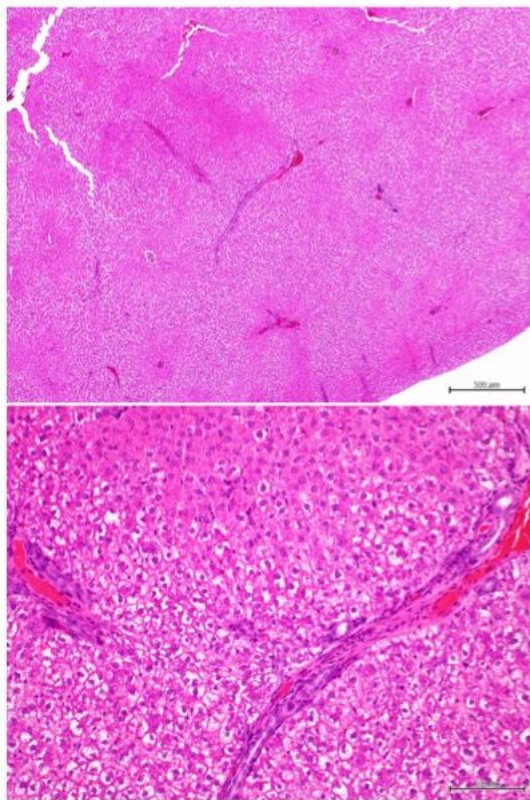
2-Nitrosopropane (2-NP) (実験1)



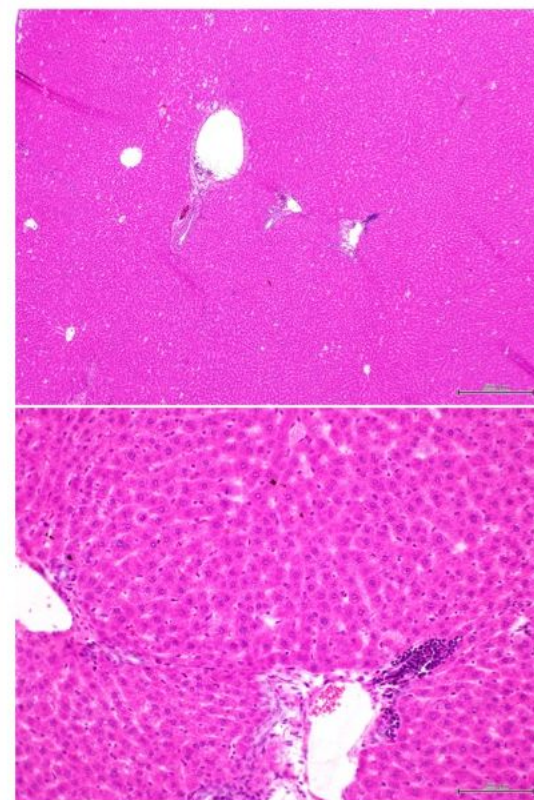
Nitrosodibutylamine (NB)



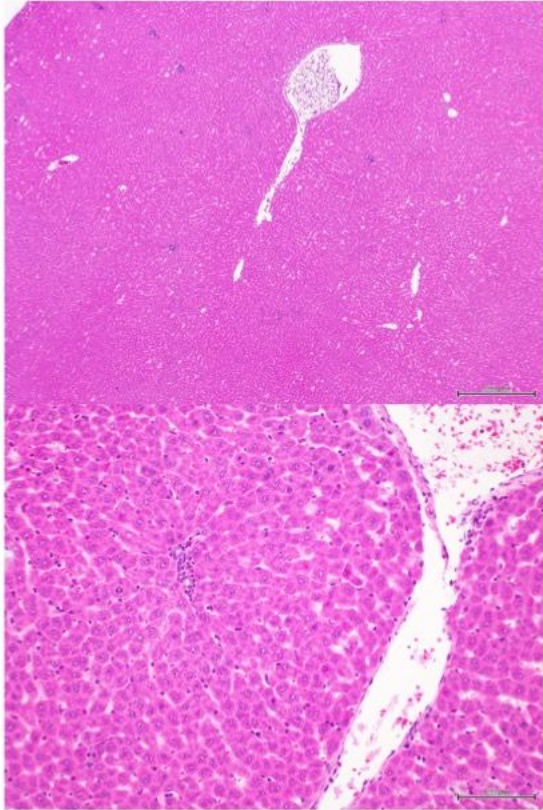
N-Nitrosopyrrolidine (NNP)



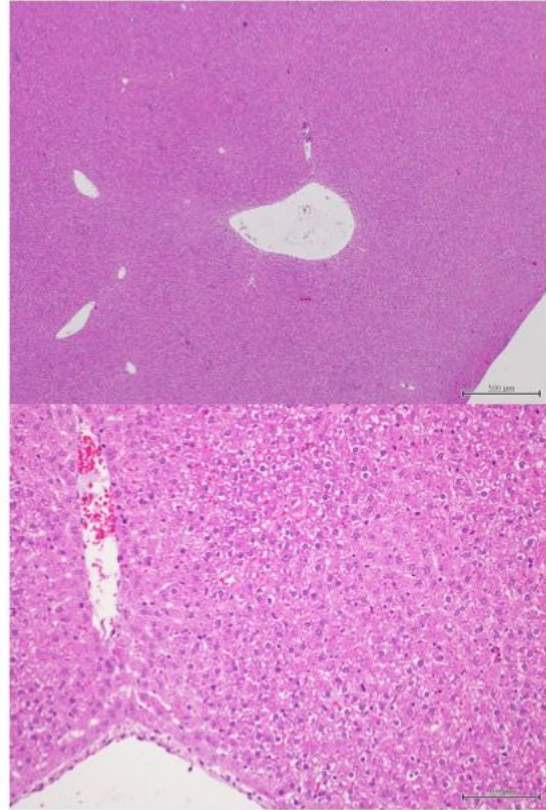
Promethazine (PMZ)



Sulindac (SUL)



Tetracycline (TC)



0.5% Methyl cellulose (MC) (実験1)

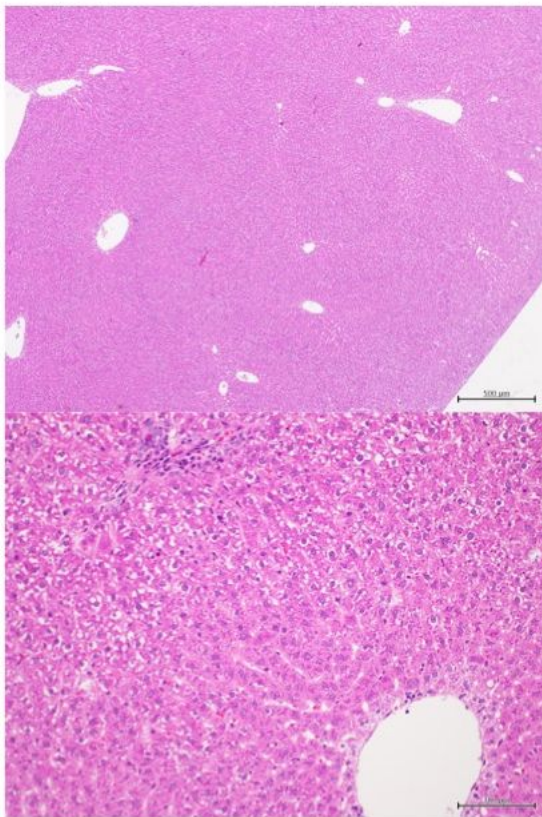
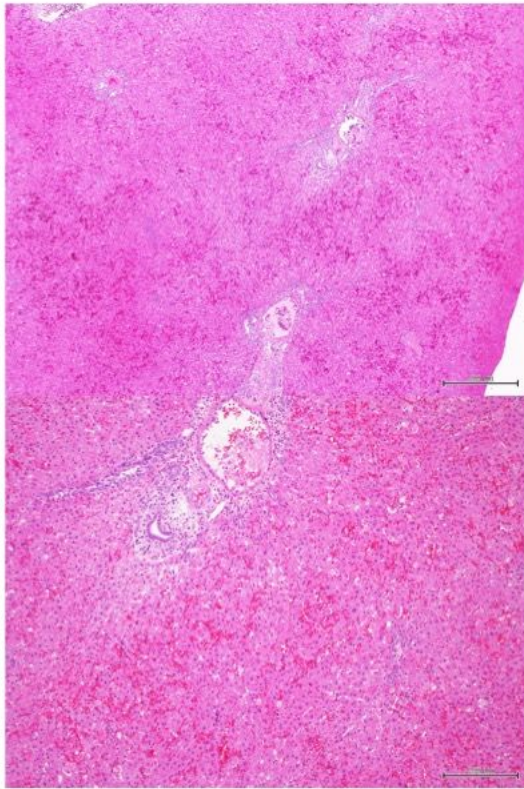
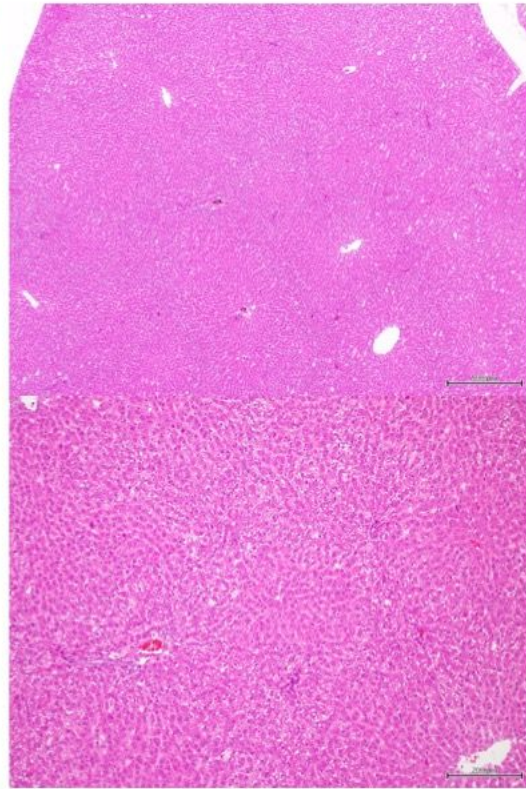


図2 肝臓の組織所見（実験2）

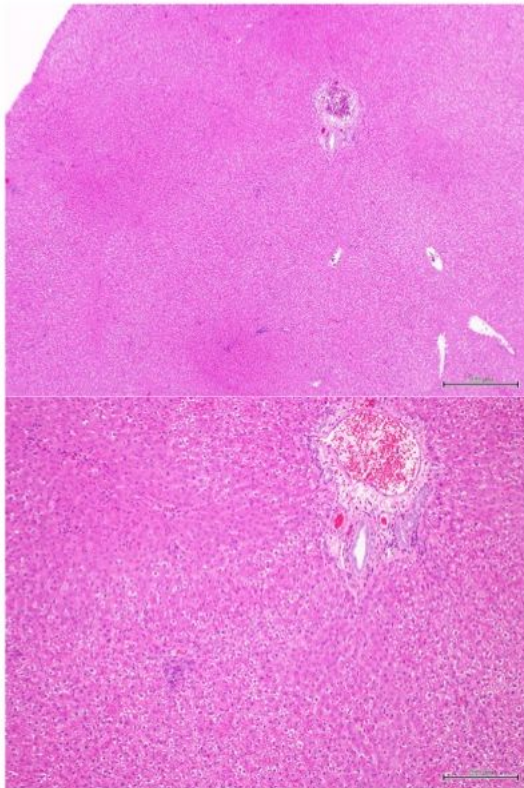
2-Nitrosopropane (2-NP) (実験2)



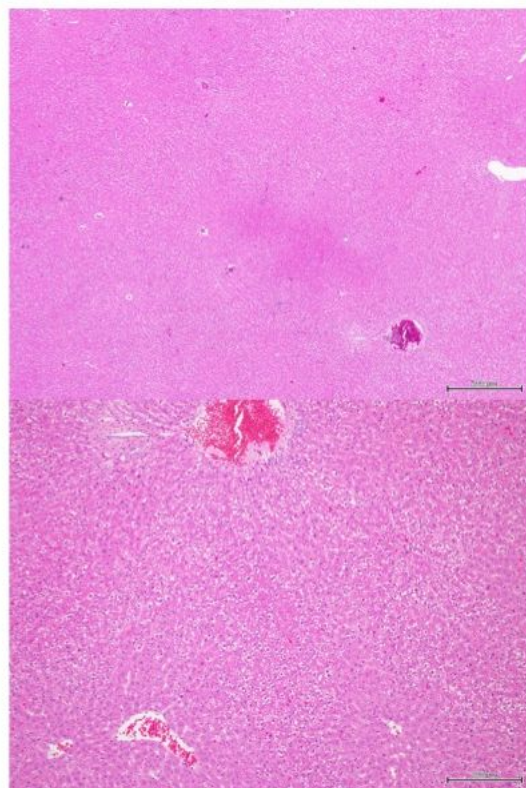
3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene



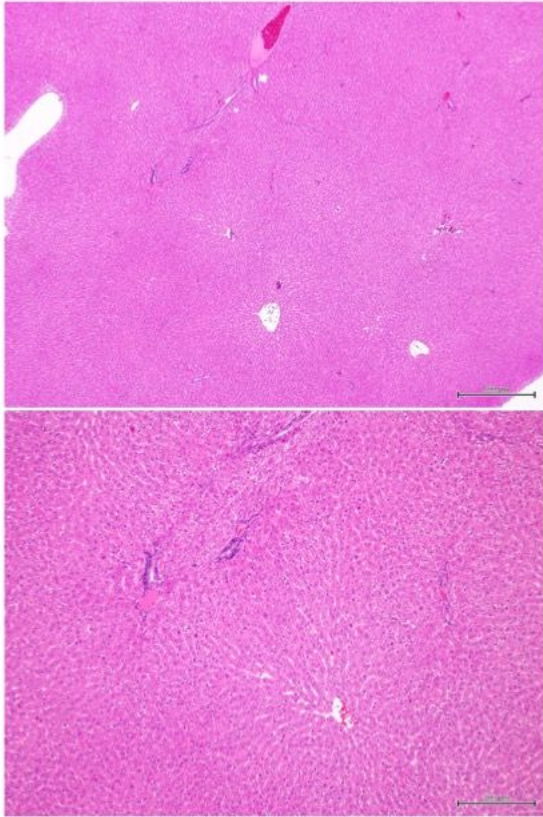
Ethionamide



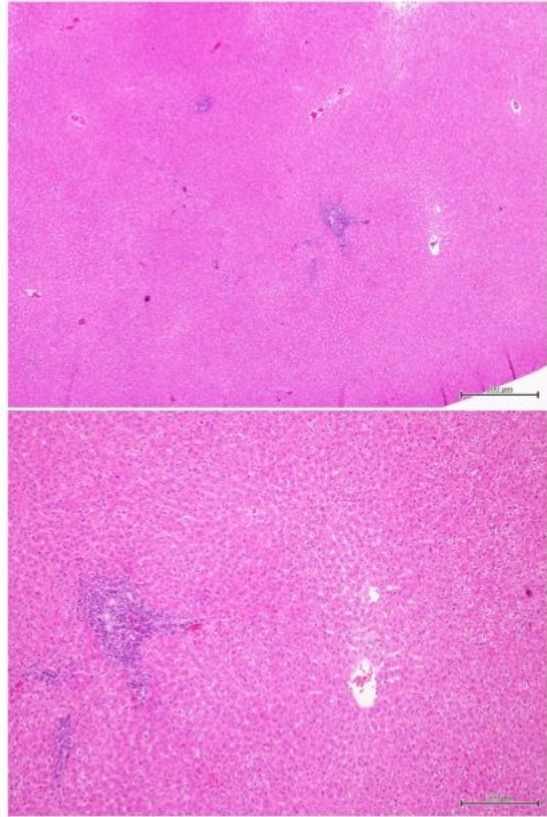
Theophylline



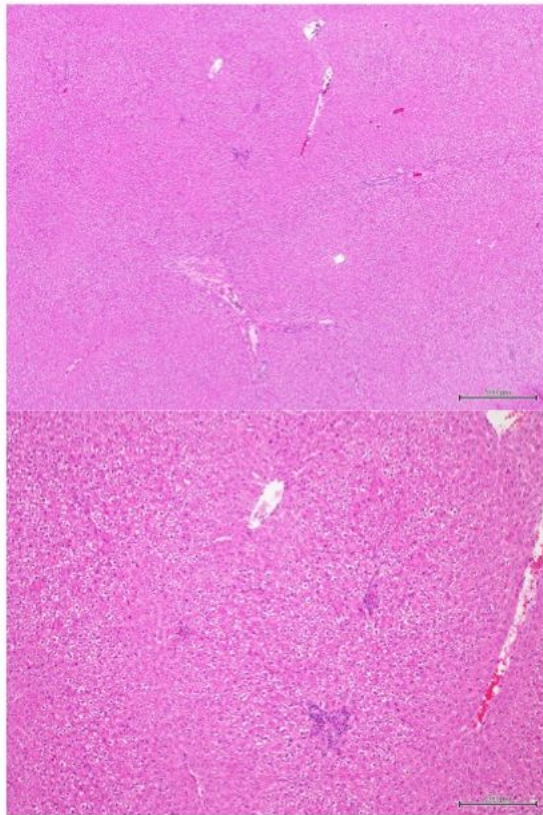
Caffeine



Chloramphenicol



0.5% Methyl cellulose (MC) (実験 2)



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 29 年度分担研究報告書

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）
分担研究項目：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

研究分担者 塚本徹哉 藤田保健衛生大学医学部病理診断科 准教授

研究要旨

環境中の化学物質の発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は喫緊の課題である。本研究では、遺伝毒性発がん性マーカーセットにより、遺伝毒性肝発がん性を判定できる 24 時間ラット超短期動物試験系を用い、化学物質の肝発がん性の評価法を検討した。遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質 10 種類(N-Nitrosodiethylamine, N-Nitrosodiethanolamine, N-Nitrosoethylmethylamine, Monocrotaline, Phenobarbital, Cyclophosphamide, Nitrofurantoin, Phenacetin, Indomethacin, Phenylbutazone, 2-Nitropropane)について、6 週齢オス Sprague-Dawley (SD)ラット単回強制胃内投与試験を行い、24 時間後に肝から total RNA を抽出後、real time RT-PCR 法により 10 遺伝子の発現データを取得した。対照群を 0 としたときの Ct 値を用いて、サポートベクターマシーン (SVM)による肝発がん性予測数理学的モデルを用いて解析した結果、概ね、遺伝毒性肝発がん物質とその他の化学物質の分離が可能であった。しかし、Monocrotaline に関しては、従来知見と異なる評価となったため、今後更なる検討が必要と考えられた。

A . 研究目的

環境中の化学物質の発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は喫緊の課題である。本研究では、トキシコゲノミクス手法から得た遺伝毒性発がん性マーカーセットにより、遺伝毒性・発がん性を判定できるラット超短期動物試験系を用い、化学物質の遺伝毒性・発がん性評価法の確立を目指す。

B . 研究方法

4 種類の遺伝毒性肝発がん物質 (Group 1 (G1): N-Nitrosodiethylamine (NDEA), G2: N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), G3: N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), G4: 2-Nitropropane (2-NP))、2 種類の非遺伝毒性肝発がん物質 (G5: Monocrotaline (MCT), G6: Phenobarbital (PB))、3 種類の遺伝毒性非肝発がん物質 (G7: Cyclophosphamide (CPA), G8: Nitrofurantoin (NFT), G9: Phenacetin (PCT))、2 種類の非遺伝毒性非肝発がん物質 (G10: Indomethacin (IM), G11: Phenylbutazone (PhB)) および対照群 (G12: 0.5% Methyl cellulose (MC)) について、6 週齢オス Sprague-Dawley (SD)ラット単回強制胃内投与試験 (各群 5 匹) を行い、24 時間後に剖検を行い、得られた肝組織の一部を凍結保存した (大阪市大、魏博士ら)。藤田保健衛生大学にて、肝組織から total RNA を抽出 (RNeasy mini kit, QIAGEN) 後、cDNA を作製 (SuperScript IV VIL0 Mater Mix, ThermoFisher) した。18S rRNA を内部標準として

(Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control, ThermoFisher) 既に魏博士らが予備的検討を行った 10 遺伝子について、real time RT-PCR 法により遺伝子発現データを取得した。結果は、対照群を 0 としたときの Ct 値で表した。その値を、大阪市大で構築済の肝発がん性予測モデル (サポートベクターマシーン (SVM)による数理学的アルゴリズムによるモデル) に入力し、遺伝毒性肝発がん性の評価を行った。

C . 研究結果

G12 を 0 とした時の 10 遺伝子 (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) の Ct 値は、それぞれ以下の通りであった。
G1: 5.2, 3.4, 1.5, 4.0, 5.3, 2.1, 2.4, 2.0, 2.7, -2.7; G2: 3.7, 2.2, 1.0, 2.8, 2.8, 1.2, 1.1, 1.1, 1.7, -0.7; G3: 7.4, 5.1, 2.1, 5.4, 6.1, 3.1, 3.3, 2.8, 4.1, -1.7; G4: 4.0, 4.8, 1.4, 4.1, 3.9, -1.3, 1.8, 0.9, 3.2, -3.2; G5: 3.9, 1.8, 0.6, 1.7, 2.4, -0.4, 0.6, 0.5, 0.9, -0.8; G6: 1.2, 0.5, 0.3, 0.2, 0.4, -0.8, 0.6, 0.4, 1.1, -0.0; G7: 2.6, 1.3, 1.2, 1.6, 0.9, 1.1, 0.8, 0.9, 0.8, 1.0; G8: 0.0, 0.9, 0.4, 0.5, -0.1, 0.4, 0.4, 0.4, 0.2, 0.2; G9: -1.0, 0.5, 0.9, -0.0, -0.3, -0.4, 0.1, 0.1, -0.2, 0.2; G10: -1.1, -0.5, 0.1, 0.3, -1.2, -0.8, -0.3, -0.3, -0.8, -0.7; G11: -0.1, 0.7, 0.2, 0.4, 0.3, 0.0, 0.2, 0.3, 0.3, 0.1. F, J 以外は、G1-G7 で G12 より陽性の値が得られ、特に G1-G5 で高値であった。SVM による解析の結果では、G1-G5 が陽性、G6-

G11 が陰性と評価された。

D . 考察

SVM による予測モデルによる解析の結果、NDEA, NDELA, NEMA, 2-NP, MCT が陽性、PB, CPA, NFT, PCT, IM, PhB が陰性と判定された。4 種類の遺伝毒性肝発がん物質 (NDEA, NDELA, NEMA, 2-NP) については正しく評価された。MCT は非遺伝毒性肝発がん物質であったが、陽性との判定であった。他の非遺伝毒性肝発がん物質 (PB)、遺伝毒性非肝発がん物質 (CPA, NFT, PCT)、非遺伝毒性非肝発がん物質 (IM, PhB) については予測通りに陰性と評価された。

E . 結論

24 時間という超短期間で、10 遺伝子の発現量の変動を解析することにより、概ね遺伝毒性肝発がん性の予測が可能なモデルの構築が可能と判断された。従来知見と異なる評価となったものがあつたが、今後更なる検討が必要と考えられた。

G . 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tsukamoto, T, Nakagawa, M, Kiriya, Y, Toyoda, T, Cao, X. Prevention of Gastric Cancer: Eradication of Helicobacter Pylori and Beyond. Int J Mol Sci 18, E1699, 2017.

- (2) Tahara, S, Tahara, T, Tsukamoto, T, Horiguchi, N, Kawamura, T, Okubo, M, Ishizuka, T, Nagasaka, M, Nakagawa, Y, Shibata, T, Kuroda, M, Ohmiya, N. Morphologic characterization of residual DNA methylation in the gastric mucosa after Helicobacter pylori eradication. Cancer Med 6: 1730-1737, 2017.

2. 学会発表

- (1) 岡部麻子、桐山諭和、鈴木周五、櫻井浩平、高橋智、塚本徹哉、DNA 二重鎖切断マーカー -H2AX を用いた胃発がん物質の短期同定、日本毒性病理学会、2018 年 1 月 (沖縄)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1 . 特許取得

なし。

2 . 実用新案登録

なし。

3 . その他

なし。

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 29 年度分担研究報告書

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）
分担研究項目：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

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的とし、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの開発および検証を行った。遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質 30 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、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いて肝発がん性を予測した。その結果、全ての遺伝毒性肝発がん物質（9 物質）について陽性判定が得られ（感度 100%）、その他の 21 物質中 19 物質で陰性判定が得られた（特異度 90.5%）。以上の結果から、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。

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・安心を保障する重要な基盤となる。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発展・高精度化し、高精度発がん評価モデルとして確立する。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最終目的として、6研究施設による協同体制にて下記に記す三つの研究を実施する。第一に、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。第二に、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。第三に、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。

平成 29 年度は、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を確立するために、9 種類の遺伝毒性肝発がん物質及び 21 種類のそれ以外の化合物（非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の遺伝毒性および非遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性非発がん物質）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。

B．研究方法

遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質 30 種類について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。動物試験および遺伝子解析は 3 施設（香川大・藤田保健衛生大・大阪市立大）で行われた。

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。

（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

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（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）を「陰性」と判定する。その結果、全ての遺伝毒性肝発がん物質（9 物質）について陽性判定が得られ（感度 100%）、遺伝毒性陰性の非発がん物質 21 物質のうち、ethionamide と Monocrotaline を除く 19 物質で陰性判定が得られた（特異度 90.5%）。

D．考察

遺伝毒性陰性の非発がん物質 ethionamide が遺伝毒性物質として判定されたが、*in vitro* 遺伝毒性試験では毒性を引き起こす用量で遺伝毒性陽性であったと

報告がある。今回の投与量はLD50の1/3量という高い投与量であったため、ethionamideが遺伝毒性作用に関連する遺伝子の変動を惹起したと推測される。Monocrotalineは非遺伝毒性肝発がん物質であったが、陽性との判定であったため、今後更なる検討が必要と考えられた。その他の被験物質については誤りなく判定されており、本遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた判定方法は遺伝毒性発がん物質の検出に有用と期待される。

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(+) 肝発がん物質	2-Nitropropane (2-NP)(陽性対照物質)	240	Positive
	o-Aminoazotoluene (AAT)	500	Positive
	N-Nitrosodimethylamine (DMN)	10	Positive
	4,4'-Thiodianiline (TDA)	300	Positive
	Nitrosodibutylamine (DBA)	400	Positive
	N-Nitrosopyrrolidine (NPYR)	300	Positive
	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (DMAB)	500	Positive
	N-Nitrosodiethylamine (NDEA)	70	Positive
	N-Nitrosodiethanolamine (NDELA)	2000	Positive
	N-Nitrosoethylmethylamine (DEMA)	30	Positive
Ames(-) 臓器発がん性 (-)	Diazepam (DZP)	80	Negative
	Disulfiram (DSF)	170	Negative
	Phenytin (PHE)	550	Negative
	Rotenone (ROT)	20	Negative
	Tolbutamide (TLB)	830	Negative
	Aspirin (ASA)	70	Negative
	Triamterene (TRI)	130	Negative
	Promethazine (PMZ)	190	Negative
	Sulindac (SUL)	90	Negative
	Tetracycline (TC)	270	Negative
	Ethionamide (ETH)	440	Positive
	Theophylline (TEO)	80	Negative
	Caffeine (CAF)	60	Negative
	Chloramphenicol (CMP)	830	Negative
	非遺伝毒性肝発がん物質	Monocrotaline (MCT)	20
Phenobarbital (PB)		50	Negative
Ames(+) 肝以外の臓器発がん性	Cyclophosphamide (CPA)	30	Negative
	Nitrofurantoin (NFT)	200	Negative
Ames(-) 肝以外の臓器	Phenacetin (PCT)	550	Negative
	Indomethacin (IM)	1	Negative
	Phenylbutazone (PhB)	80	Negative

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tachibana H, Gi M, Kato M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers. *Cancer Sci*, 108, 331-337, 2017.
- 2) Yamaguchi T, Gi M, Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp Toxicol Pathol*. 69, 1-7, 2017.
- 3) Ishii N, Gi M, Fujioka M, Yamano S, Okumura M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid exerts promotion effects on hepatobiliary

carcinogenesis in a rat medium-term multiorgan carcinogenicity bioassay. *J Toxicol Pathol*. 30, 39-45, 2017.

- 4) Kakehashi A, Stefanov VE, Ishii N, Okuno T, Fujii H, Kawai K, Kawada N, Wanibuchi H. Proteome Characteristics of Non-Alcoholic Steatohepatitis Liver Tissue and Associated Hepatocellular Carcinomas. *Int J Mol Sci*. 18, 2017.
- 5) Doi K, Fujioka M, Sokuza Y, Ohnishi M, Gi M, Takeshita M, Kumada K, Kakehashi A, Wanibuchi H. Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis. *In Vivo*. 31, 187-197, 2017.
- 6) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Doi K, Okuno T, Kakehashi A, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 104 weeks. *J Toxicol Sci*. 42, 475-483, 2017.
- 7) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Fukushima S, Wanibuchi H. Progression of Hepatic Adenoma to Carcinoma in *Ogg1* Mutant Mice Induced by Phenobarbital. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:8541064, 2017.
- 8) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. Enhanced Susceptibility of *Ogg1* Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 18, pii: E1801, 2017.

2. 学会発表

- 1) 鰐淵英機. 実験的アプローチを用いたヒ素発がん性の証明とその機序の解明. 第106回日本病理学会総会、東京(2017年4月)
- 2) 鰐淵英機、魏 民、藤岡正喜、梯アンナ. ヒ素の発がんリスク評価. 第44回日本毒性学会学術年会、神奈川(2017年7月)
- 3) 藤岡正喜、魏 民、河内聡子、梯アンナ、鰐淵英機. 1,2-ジクロロプロパンおよびジクロロメタン複合曝露によるマウス肝臓への影響. 第44回日本毒性学会学術年会、神奈川(2017年7月)
- 4) 奥野高裕、梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機. NASHモデルマウスを用いた肝細胞癌の発がんメカニズム解析. 第32回発癌病理研究会、滋賀(2017年8月)
- 5) 香山侑弘、魏 民、藤岡正喜、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. BBN誘発マウス膀胱がんにおける *Ink4a/Arf* の役割の検討. 第76回日本癌学会学術総会、神奈川(2017年9月)
- 6) 魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、香山侑弘、熊田賢次、鰐淵英機. BBN誘発マウス膀胱がんモデルにおける Acetazolamide の抑制効果の検討. 第76回日本癌学会学術総会、神奈川(2017年9月)

- 7) 藤岡正喜、魏 民、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機 . CD1 マウスにおけるジメチルアルシン酸(DMA)の胎児期ばく露による発がん性 . 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 8) 梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機 . 非アルコール性脂肪肝炎の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析 . 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 9) 鰐淵英機 . 芳香族アミンによる膀胱癌の臨床病理学的研究と AAOT の毒性、発がん性評価 . 第 45 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、山形 (2017 年 10 月)
- 10) 藤岡正喜、魏 民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、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 . 第 23 回ヒ素シンポジウム、茨城 (2017 年 12 月)
- 11) 魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機 . 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の開発 . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 12) 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機 . 2 つの NASH モデルマウスにおける病理組織学的所見の違い . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 13) 藤岡正喜、魏 民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、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 . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 14) 梯アンナ、奥野高裕、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機 . NASH の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析 . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 15) 熊田賢次、奥野高裕、魏 民、藤岡正喜、行松直、梯アンナ、鰐淵英機 . O-Acetoacetoluidide(AAOT)の毒性影響の検討 . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 16) 熊田賢次、藤岡正喜、魏 民、大石裕司、奥野高裕、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 . 第 17 回分子予防環境医学研究会、三重 (2018 年 2 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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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）
分担研究項目：網羅的な DNA 付加体解析法を用いた化学物質の DNA 損傷性評価

研究分担者 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

研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、DNA 付加体の網羅的解析手法(DNA アダクトーム法)の構築に取り組んできた。本年度は、肝発がん性検出評価系の再現性確認と施設間バリデーション試験の実施に用いたラット肝臓サンプルを用い、複数の遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価を、アダクトーム法により検討した。遺伝毒性ラット肝発がん物質として、2-Nitropropane (2-NP；陽性対照) o-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 4,4' -Thiodianiline (TDA)、非遺伝毒性非肝発がん物質：Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI)をそれぞれラットに投与し、24 時間後に肝臓に生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。得られたデータを主成分解析(PCA)解析により分類したところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性非発がん物質の3つのグループに分離できた。遺伝毒性肝発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質から得られたデータをそれぞれ別々に PCA した結果、両者ともコントロールと分離されてはいるものの、非遺伝毒性非肝発がん物質ではあまりコントロールとの距離が離れていないことから、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。今後、これら付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても検討を行なう予定である。

A . 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験 (変異原性試験)、コメットアッセイ (DNA 損傷試験)、小核試験 (染色体異常試験) などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは化学物質の発がん性の予測は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考え。これまで我々は、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法 (アダクトーム法) を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて確かめてきた。これまでに、遺伝毒性を示すマグネタイトナノ粒子を気管内投与したマウス肺の解析を行ない、マグネタイトナノ粒子が誘発する G:C->A:T 及び G:C->T:A 変異の基となる付加体 (エテノデオキシシチジン、-dC) を含む複数の付加体を確認することを報告した。この結果は、アダクトーム法による化学物質の DNA 損傷性評価が有用であることを示唆するものである。今年度は、ラットを用いた *in vivo* モデルに用い、肝臓をターゲットとした複数の遺伝毒性/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓における DNA 損傷を LC-MS を用いたアダクトーム解析により検討し、DNA 付加体の生成を指標とした有害性評価の検証を行なう。

B . 研究方法

雄性 SD ラット (各群それぞれ 5 匹) に遺伝毒性肝発がん物質；2-Nitropropane (2-NP；陽性対照)、

o-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 4,4' -Thiodianiline (TDA)、非遺伝毒性非肝発がん物質；Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI) を各種濃度 (表 1 参照) で投与を行った後 24 時間後に肝臓を摘出した。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。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) 解析により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C . 研究結果

各種化学物質を投与したラット肝臓 DNA のアダクトー

△解析を行なった結果を図1に示す。PCA解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の3つのグループに分離されることがわかった。遺伝毒性肝発がん物質と非遺伝毒性非肝発がん物質から得られたデータをそれぞれ別々にPCAした結果、両者ともコントロールと分離されていないものの、非遺伝毒性非肝発がん物質ではあまりコントロールとの距離が離れていないことから、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(図2)。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(図3)。つまり、遺伝毒性肝発がん物質由来のDNA付加体が生成していることが推測される。更に、これら投与化学物質に由来する特徴的な付加体の探索をバイオインフォマティクス解析により実施した。その結果、ボルケーノプロットより、遺伝毒性肝発がん物質に特徴的な付加体をいくつかスクリーニングした(図4、5)。我々が構築した in-house DNA adduct database との比較により、これら付加体の同定を試みたが、類似する m/z 値を持つ付加体はほとんど見つからなかった。引き続き今後、これら投与化学物質に由来する特徴的な付加体の探索を行うと同時に、別の化学物質を投与したラット肝臓についても同様に検討を行う予定である。

表1 使用した化学物質

Group	Chemical Name	Category	LD50 mg/kg (Rat, Oral)	投与量 (1/3 of LD50)
Group 1	α-Aminozetoluene (AAT)	遺伝毒性肝発がん物質	1500	500
Group 2	Dimethylnitrosamine (DMN)	遺伝毒性肝発がん物質	37	10
Group 3	4,4'-Thiodianiline (TDA)	遺伝毒性肝発がん物質	900	300
Group 4	2-Nitropropane (2-NP)	遺伝毒性肝発がん物質 (陽性対照群)	720	240
Group 5	Diazepam (DZP)	非遺伝毒性非肝発がん物質	249	80
Group 6	Disulfiram (DSF)	非遺伝毒性非肝発がん物質	500	170
Group 7	Phenoin (PHE)	非遺伝毒性非肝発がん物質	1635	550
Group 8	Rotenone (ROT)	非遺伝毒性非肝発がん物質	60	20
Group 9	Talbutamide (TLB)	非遺伝毒性非肝発がん物質	2490	830
Group 10	Aspirin (ASA)	非遺伝毒性非肝発がん物質	200	70
Group 11	Triamterene (TR)	非遺伝毒性非肝発がん物質	400	130
Group 12	0.5% Methyl cellulose (MC)	対照群		5ml/kg b.w.

図1 遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)

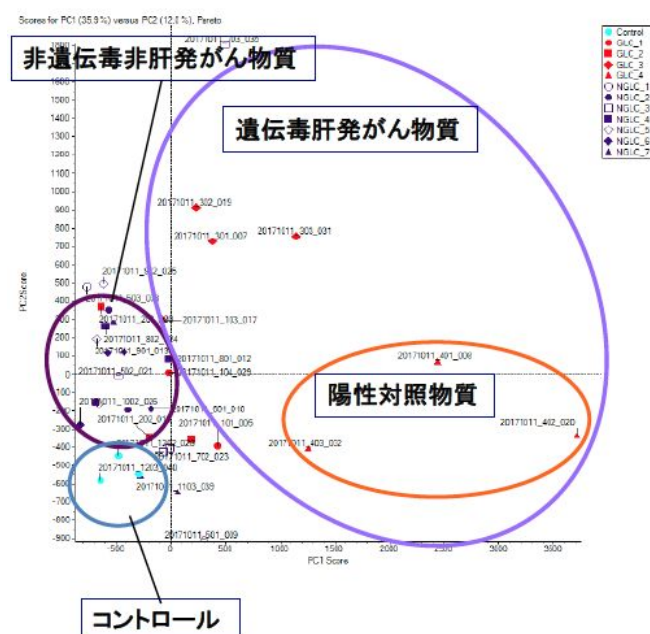


図2 非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)

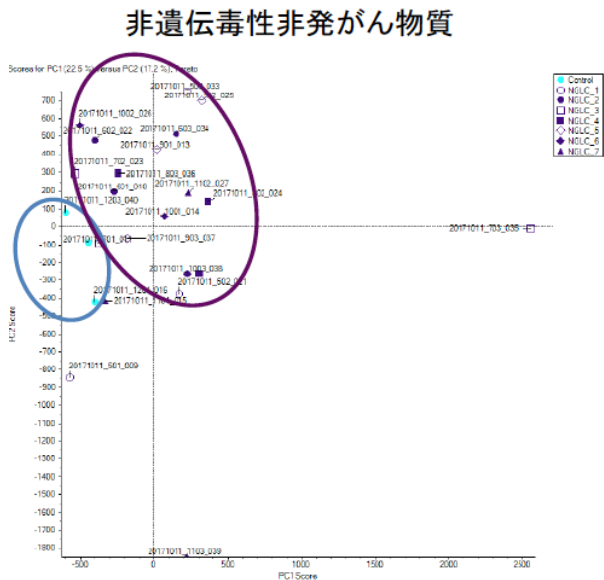


図3 遺伝毒性肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)

遺伝毒性発がん物質

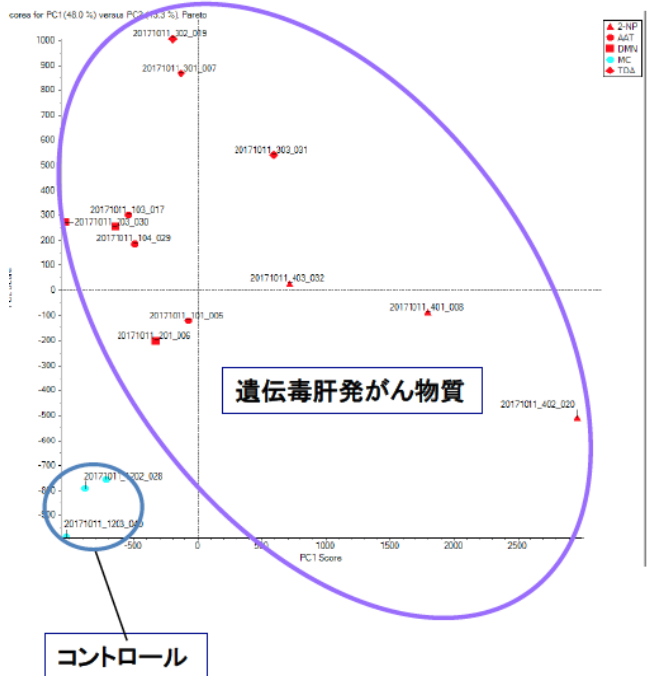


図4 ボルケーノプロットによる遺伝毒性/非遺伝毒性非肝発がん物質のグルーピングに寄与する付加体の探索

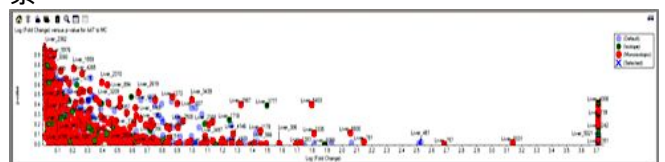


図5 ポルケーノプロットで抽出された付加体存在量（遺伝毒性化学物質に特徴的なもの）

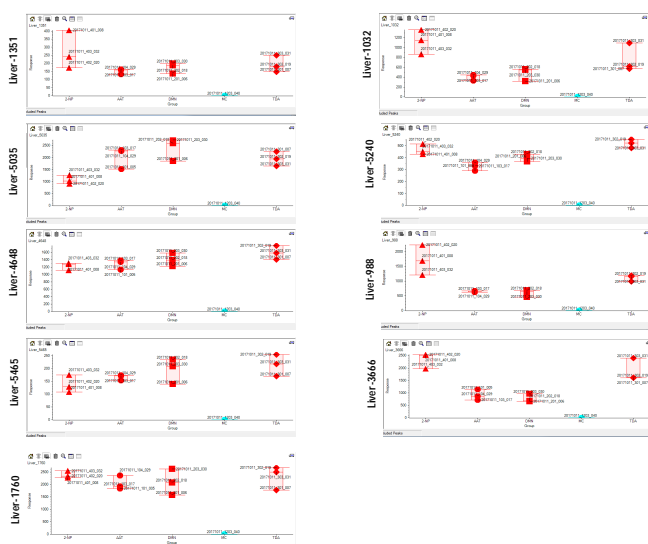


表2 候補付加体のデータベースとの比較による構造探索

Adduct ID	M/Z [M+H]	データベースとの比較 [M+H]	付加体の由来
Liver-1351	300.2686	Sp (300.0944)	酸化dG
Liver-5035	306.1643	5,6-dihydro-M1dG, MDA-dA (306.1202)	MDA
Liver-4648	317.2216	該当なし	
Liver-5465	367.0015	該当なし	
Liver-1760	500.271	該当なし	
Liver-1032	510.2534	該当なし	
Liver-5240	510.2988	該当なし	
Liver-988	483.275	該当なし	
Liver-3666	576.3189	該当なし	

D. 考察

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解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の3つのクラスターに分離されることがわかった。遺伝毒性肝発がん物質と非遺伝毒性非肝発がん物質から得られたデータをそれぞれ別々にPCAした結果、両者ともコントロールと分離されてはいるものの、非遺伝毒性非肝発がん物質ではあまりコントロールとの距離が離れていないことから、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。このことは、非遺伝毒性非肝発がん物質がDNA損傷（付加体）を殆ど作成しないため、その結果、溶媒対照とほとんど変化していないと推測される。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、その差が大きいために予想された。つまり、遺伝毒性肝発がん物質由来のDNA付加体が生成していることが推測される。遺伝毒性肝発がん物質とコントロールとの距離に着目してみたところ、2-NP（陽性対照）とTDAがよりコントロールと離れたクラスターを形成しており、AATとDMNがコントロールにやや近いクラスターを形成している。その理由については未だ分からないが、これら化学物質間でDNA損傷性や発がんメカニズムが異なることを示唆しているかもしれない。更にデータを追加してこれらの点を解明していくことが必要である。今後、これら投与化学物質に由来する特徴的な付加体の探索及び同定を行うと

同時に、別の化学物質を投与したラット肝臓についても同様に検討を行う予定である。

E. 結論

遺伝毒性ラット肝発がん物質として、2-NP（陽性対照）、AAT, DMN, TDA、非遺伝毒性非肝発がん物質としてDZP, DSF, PHE, ROT, TLB, ASA, TRIをそれぞれラットに投与し、24時間後に肝臓に生成されるDNA付加体を網羅的に解析した。得られたデータをPCA解析により分類したところ、コントロール、非遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質の3つのグループに分離できた。遺伝毒性肝発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質から得られたデータをそれぞれ別々にPCAした結果、両者ともコントロールと分離されてはいるものの、非遺伝毒性非肝発がん物質ではあまりコントロールとの距離が離れていないことから、非遺伝毒性非肝発がん物質がDNA損傷（付加体）を殆ど作成しないため、その結果、溶媒対照とほとんど変化していないと予想された。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、遺伝毒性肝発がん物質由来のDNA付加体が生成していることが予測された。今後、これら投与化学物質に由来する特徴的な付加体の探索及び同定を行うと同時に、別の化学物質を投与したラット肝臓についても同様に検討を行う予定である。

アダクトーム法を化学物質のリスク評価へ応用することの妥当性については、更に複数の化学物質について検討をすることが必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

（分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入）

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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 norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology*, 2017, Nov 16.
3. Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 2017, 32:455-462.
4. Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y. Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin. *Genes Environ.*, 2017, 39:12.

2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里：DNA 付加体形成と突然変異誘発 第 44 回日本毒性学会（横浜 2017 年 7 月）
2. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS (ノースカロライナ、2017 年 9 月)
3. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis 第 76 回日本癌学会学術総会（横浜 2017 年 9 月）
4. 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆：マウス正常上皮の 3 次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系 第 76 回日本癌学会学術総会（横浜 2017 年 9 月）
5. 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 46 回日本環境変異原学会（東京、2017 年 11 月）
6. 前迫裕也、善家 茜、アスマ エルザワハリ、古川英作、加藤 護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索 第 46 回日本環境変異原学会(東京、2017 年 11 月)
7. 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤 治、稲葉一穂、戸塚ゆ加里：モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析 第 46 回日本環境変異原学会（東京、2017 年 11 月）
8. 神尾翔真、斎藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立 第 46 回日本環境変異原学会（東京、2017 年 11 月）
9. Totsuka Y : Adductomics IWGT 2017（東京、2017 年 11 月）
10. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis 12thICEM-5thACEM（仁川、2017 年 11 月）
11. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017（つくば、2017 年 12 月）
12. 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）

H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

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。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline	J Appl Toxicol	38	537-43	2018
Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Sone M, Ogawa K	Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice	J Toxicol Pathol	31	73-80	2018
Hirata T, Cho YM, Suzuki I, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K	4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate mediates nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 activation by regulating reactive oxygen species production in human esophageal epithelial cells	Food Chem Toxicol	111	295-301	2018
Suzuki S, Cohen S.M, Arnold L.L, Kato H, Fuji S, Pennington K.L, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S.	Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis.	Toxicology	398-399	31-40	2018

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 the down-regulation of the androgen receptor.	Oncotarget	9(17)	13859-13869	2018
Suzuki S, Kato H, Fuji S, Kaiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S.	Early detection of prostate carcinogens by immunohistochemistry of HMGB2.	J. Toxicol. Sci.	in press		2018
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	Cancer Sci.	109	1024-1031.	2018
Tachibana H, Gi M, Kato M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H.	Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers.	Cancer Sci.	108	331-337	2017
Yamaguchi T, Gi M, Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, Wanibuchi H.	A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks.	Exp Toxicol Pathol.	69	1-7	2017
Okada S, Mizuguchi S, Izumi N, Komatsu H, Toda M, Hara K, Okuno T, Shibata T, Wanibuchi H, Nishiyama N.	Prognostic value of the frequency of vascular invasion in stage I non-small cell lung cancer.	Gen Thorac Cardiovasc Surg.	65	32-39	2017
Ishii N, Gi M, Fujioka M, Yamano S, Okumura M, Kakehashi A, Wanibuchi H.	Diphenylarsinic acid exerts promotion effects on hepatobiliary carcinogenesis in a rat medium-term multiorgan carcinogenicity	J Toxicol Pathol.	30	39-45	2017

Kakehashi A, Stefanov VE, Ishii N, Okuno T, Fujii H, Kawai K, Kawada N, Wanibuchi H.	Proteome Characteristics of Non-Alcoholic Steatohepatitis Liver Tissue and Associated Hepatocellular Carcinomas.	Int J Mol Sci.	18		2017
Doi K, Fujioka M, Sokuza Y, Ohnishi M, Gi M, Takeshita M, Kumada K, Kakehashi A, Wanibuchi H.	Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis	In Vivo.	31	187-197	2017
Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Doi K, Okuno T, Kakehashi A, Wanibuchi H.	A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 104 weeks.	J Toxicol Sci.	42	475-483	2017
Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Fukushima S, Wanibuchi H.	Progression of Hepatic Adenoma to Carcinoma in <i>Ogg1</i> Mutant Mice Induced by Phenobarbital.	Oxid Med Cell Longev.	2017:8541064		2017
Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H.	Enhanced Susceptibility of <i>Ogg1</i> Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis.	Int J Mol Sci.	18	pii: E1801	2017
Akagi J, Yokoi M, Cho YM, Toyoda T, Ohmori H, Hanaoka F, Ogawa K	Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases δ and ϵ to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening	DNA Repair	61	76-85	2017
Takeshima H, Niwa T, Toyoda T, Wakabayashi M, Yamashita S, Ushijima T	The degree of methylation burden is determined by the exposure period to carcinogenic factors	Cancer Sci	108	316-21	2017

Fuji S, Suzuki S, Naiki-Ito A, Kato H, Hayakawa M, Yamashita Y, Kuno T, Takahashi S.	The NADPH oxidase inhibitor apocynin suppresses preneoplastic liver foci of rats.	Toxicol Pathol	45	544-550	2017
Kataoka H, Miura Y, Kawaguchi M, Suzuki S, Okamoto Y, Ozeki K, Shimura T, Mizoshita T, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Asai K, Joh T.	Expression and subcellular localization of AT motif binding factor 1 in colon tumours.	Mol Med Rep	16	3095-3102	2017
Tsukamoto T, Nakagawa M, Kiriya Y, Toyoda T, Cao X	Prevention of gastric cancer: Eradication of Helicobacter pylori and beyond	Int J Mol Sci	18	1699	2017
Tsukamoto T, Nakagawa M, Kiriya Y, Toyoda T, Cao X.	Prevention of Gastric Cancer: Eradication of Helicobacter Pylori and Beyond.	Int J Mol Sci	18	E1699	2017
Tahara S, Tahara T, Tsukamoto T, Horiguchi N, Kawamura T, Okubo M, Ishizuka T, Nagasaka M, Nakagawa Y, Shibata T, Kuroda M, Ohmiya N.	Morphologic characterization of residual DNA methylation in the gastric mucosa after Helicobacter pylori eradication.	Cancer Med	6	1730-1737	2017
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.	69	637-642	2017

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 norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline.	Journal of Applied Toxicology	Nov 16		2017
Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y.	Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane.	Mutagenesis	32	455-462	2017
Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y.	Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin.	Genes Environ	39	12	2017