

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

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

(H30-食品-一般-003)

平成30年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

令和元年(2019) 5月

目 次

I. 総括研究報告書（別添 3）	
香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究	1
本間 正充	
II. 分担研究報告書（別添 4）	
QSAR と Ames 試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究	1 5
本間 正充	
Ames 試験陽性のフォローアップに関するチミジンキナーゼ遺伝子変異試験の共同研究組織の構築および実験プロトコール評価	2 1
安井 学	
AOP と定量的評価を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化	2 7
増村 健一	
Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法による評価	3 4
石井 雄二、高須 伸二、西川 秋佳、小川 久美子	
肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価	3 9
高須 伸二、石井 雄二、西川 秋佳、小川 久美子	
オルガノイドの調製、オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備	4 3
今井 俊夫	
オルガノイドの調製	5 2
落合 雅子	
オルガノイド遺伝毒性解析実験に関する研究	5 6
戸塚ゆ加里	
オルガノイド皮下移植系の病理学的評価	5 9
三好 規之	
オルガノイドを用いた新規発がんモデルの作成	6 2
筆宝 義隆	
オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備	6 5
平田 暁大	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添 5）	6 8

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

研究代表者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

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

I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

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

II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究

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

研究分担者

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

A. 研究目的

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

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

本研究班は上記の目的を達成するため、以下の研究に取り組んだ。

1. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B . 研究方法

1. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(倫理面への配慮)

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

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

C. 研究結果

I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

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

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

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

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

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

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

反応関係はほぼ直線的であり、組織による顕著な差は認められなかった。AA 1 mg/kg/day あたりの付加体形成量は 60~75 個/10⁸ 塩基であった。

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

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

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

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

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

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

D. 考 察

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

1. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

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

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

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

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

与し、一般毒性評価を開始した。

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

II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究

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

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

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

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

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

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

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

- た γ H2AX 評価系の有用性検討;MMS 共同研究オプション項目の報告. 日本環境変異原学会第47回大会 (2018.11.1)
9. 増村健一: Ames 試験陽性のフォローアップと *in vivo* 試験. 日本環境変異原学会 BMS 研究会第57回定例会 熱川 (2018.7)
 10. 増村健一、安東朋子、豊田尚美、鶴飼明子、能美健彦、本間正充: マウス雄性生殖細胞と次世代個体ゲノムの点突然変異頻度の比較. 日本環境変異原学会第 47 回大会 京都(2018.11)
 11. Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N, Ando T, Ukai A, Nohmi T, Honma M: Absence of selection against ENU-induced point mutations in male germ cells during transmission to the next generation. 49th Annual Meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society. San Antonio, USA. (2018.9)
 12. 石井雄二, 菊池玲美花, 木島綾希, 高須伸二, 小川久美子, 梅村隆志「F344 ラットを用いたアセタミドの 28 日間反復投与による肝毒性評価」第 35 回日本毒性病理学会学術集会 (2019 年 2 月、東京)
 13. 今井俊夫、成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆: マウス大腸オルガノイドにおける PhIP 誘発がん早期過程における遺伝子変異. 第 65 回日本実験動物学会総会 (2018 年 5 月、富山)
 14. 今井俊夫、成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆: マウス正常上皮組織由来オルガノイドの化学発がん物質に対する反応性. 第 25 回日本がん予防学会総会 (2018 年 6 月、高松)
 15. 成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆、今井俊夫: マウス正常上皮オルガノイドを用いた化学発がん過程の初期変化. 第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018 年 7 月、大阪)
 16. 今井俊夫: 新規 *in vivo*, *in vitro* モデルの発展とその応用 - マウス正常組織由来オルガノイドの化学発がん研究への応用. 第 35 回日本毒性病理学会学術集会シンポジウム 2 (2019 年 2 月、東京)
 17. Imai, T., Ochiai, M., Naruse, M., Hippo, Y.: Carcinogenic alteration of mouse tissue-derived organoids by chemical treatment. 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2019年3月、ボルチモア、米国)
 18. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics (コルカタ、2018 年 1 月)
 19. 戸塚ゆ加里、秋場 望、佐藤春菜、前迫有也、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、十時 泰、柴田龍弘、中釜 斉: 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第 33 回発がん病理研究会 (御殿場、2018 年 8 月)
 20. 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二: 芳香族アミン類の代謝物分析と DNA 付加体 第 33 回発がん病理研究会 (御殿場、2018 年 8 月)
 21. Totsuka Y, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Nakagama H: Whole genome sequencing analysis elucidates the interaction between environmental factors and causes of human cancer. 第 77 回日本癌学会総会 (大阪、2018 年 9 月)
 22. 斎藤春五、高橋沙奈衣、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊: ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第 77 回日本癌学会総会 (大阪、2018 年 9 月)
 23. 高橋沙奈衣、斎藤春五、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊: 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)
24. 戸塚ゆ加里、佐藤春菜、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、遠藤 治：全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
 25. 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里：マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
 26. 前迫侑也、椎崎一宏、高村岳樹、戸塚ゆ加里：職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析) 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
 27. 神尾翔真、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：ナノマテリアルの表面修飾が及ぼす遺伝毒性への影響 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
 28. 斎藤春吾、渡邊昌俊、戸塚ゆ加里：ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
 29. 石野孔祐、前迫侑也、内藤善哉、戸塚ゆ加里：質量分析データに基づく DNA 付加体データベースの整備 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
 30. 川上真由子、橋詰力、三好規之：キノコ抽出物における骨格筋萎縮予防化合物の探索、第 41 回日本分子生物学会 (横浜), 2018 年 11 月 28-30 日
 31. 橋詰力、永田光風、佐藤隆一郎、三好 規之：横浜大豆タンパク質 コングリシニン摂取時の脂質組成解析、第 41 回日本分子生物学会 (横浜), 2018 年 11 月 28-30 日
 32. 永田光風、橋詰力、伊藤圭祐、三浦進司、三好規之：TRPA1・TRPM8 を介した脂質組成変動によるロコモティブシンドローム予防法の検討、第 41 回日本分子生物学会 (横浜), 2018 年 11 月 28-30 日
 33. 田島悠也、豊田武士、平山裕一郎、橋詰力、松下幸平、小川久美子、渡辺賢二、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之：膀胱発がん性芳香族アミン o-toluidine の代謝物分析と DNA 付加体 Metabolomics and DNA adductome analysis of urinary bladder carcinogen o-toluidine, 日本環境変異原学会第 47 回大会 (京都), 2018 年 11 月 1-2 日
 34. 久富優太、小田美光、下原千晶、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、八木孝司、梶村春彦、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜：コリバクチン産生大腸菌の in vitro 遺伝毒性試験、日本環境変異原学会第 47 回大会 (京都), 2018 年 11 月 1-2 日
 35. 松山弘希、田中航、鈴木悠、三好規之、松浦靖、柚木崎千鶴子、宮崎達雄、道本英之、窄野昌信、榊原啓之：ApoE 欠損マウスを用いた天日干しダイコンの機能性の探索、平成 30 年度日本栄養・食糧学会 九週・沖縄支部大会 (宮崎), 2018 年 10 月 20-21 日
 36. 豊田武士、山田貴宣、三好規之、小川久美子：芳香族アミン誘発ラット膀胱発がん過程の初期段階における遺伝子発現動態、第 77 回日本癌学会学術総会 (大阪), 2018 年 9 月 27-29 日
 37. 平山裕一郎、田島悠也、恒松雄太、三好規之、若林敬二、渡辺賢二：検出困難な遺伝毒性物質コリバクチンを見出すための DNA 付加体の解析、日本生薬学会第 65 回大会 (広島), 2018 年 9 月 16-17 日
 38. 吉川祐人、鈴木悠、橋詰力、高垣晶子、平山裕一郎、岸本真治、渡辺 賢二、中村順行、原征彦、三好規之：ラット尿中の緑茶カテキン由来腸内細菌代謝物一斉分析、第 23 回日本フードファクター学会・第 12 回日本ポリフェノール学会・第 15 回日本カテキン学会・合同学術集会 (京都), 2018 年 9 月 7-8 日
 39. 加藤麻衣、橋詰力、吉田卓矢、田村謙太郎、中村俊之、中村宜督、三好規之：自然薯およ

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

平成 30 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究課題名：QSARとAmes試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究

研究分担者 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 部長
協力研究者 杉山 圭一 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部
協力研究者 北澤 愛莉 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部
協力研究者 笠松 俊夫 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

研究要旨

変異原性試験未実施の食品香料化合物 3,942 物質について、Lhasa Limited (UK)の DEREK Nexus と MultiCASE Inc. (USA) の CASE Ultra の 2 つの QSAR 用いてエームス変異原性の予測を行ったところ 58 化合物で陽性と予測された。この内 10 化合物について実際のエームス試験を実施したところ、9 化合物が陽性を示した。これら香料の安全性確保のためには、ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験、in vivo トランスジェニックマウス遺伝子突然変異等の上位試験によりその変異原性を検証する必要がある。また、今回 QSAR による変異原性香料物質の陽性予測率は 90%と評価された。この結果は香料の変異原性評価に QSAR 手法が十分に利用できることを示している。

キーワード:食品香料、エームス試験、定量的構造活性相関 (QSAR)

A . 研究目的

食品に香料として用いられる化学物質は食品の香気成分として存在するもの、もしくはその類似化学物質を指す。主に、炭素、水素、酸素、窒素、硫黄を元素成分とする比較的 low molecular weight の化学物質であり、特定の官能基を有すものが多い。日本では食品香料の多くは化学構造分類に従い、18 種類に分類されており、現在、全部で約 3,100 種類の食品香料が包括的に指定されている。また、これとは別に、バニリンなどの使用量が多い 78 品目が分離指定されている。一方、米国では 2,200 品目、欧州では 2,700 品目の香料が使用されているが、世界で共通に使用されている香料は 1,550 品目に過ぎない。香料の安全性評価に各国の相違

があることに原因の一つがあるが、早期の国際的調和が望まれる。

香料は、一般に数十から数百種類混合して用いられることが多いが、個々の香料の食品への添加量は数 ppt から数 ppm レベルで有り、過剰摂取は考えられないことから、一般毒性の懸念は少なく、問題となる毒性は変異原性である。変異原性はがんの原因で有り、DNA に損傷を与え、突然変異を誘発し、その作用には、閾値がないと考えられている。従って、変異原性のある化学物質の摂取は、それがたとえ微量であっても、発がんリスクはゼロにはならないため厳しい管理が要求される。JECFA では変異原性を含むいかなる毒性であっても、その曝露レベルが TTC (毒性学的

懸念の閾値)以下であれば安全性に問題ないとしているが、暴露評価が適切に行われていない場合は、変異原性の有無が問題となることが多い。そのため、食品香料の安全性評価のためには適切な変異原性試験の実施が重要である。

細菌を用いる復帰突然変異試験(エームス試験)は重要な変異原性試験であるが、試験の実施には約 2g 程度のサンプルが必要である。一方、工業製品としての香料の生産量は極めて少なく、試験が不可能であることも多い。また、香料独特の香気(臭気)から実験室内での試験が困難である場合もある。このため、エームス変異原性をインシリコ手法である QSAR により評価する方法が注目されている。

本研究班では食品香料化合物データベース 2015 年版掲載物質 4,549 物質から、混合物、構造が記載されていない物質を除き、3,942 物質を電子データ化した。この 3,942 物質について、Lhasa Limited (UK) の DEREK Nexus と MultiCASE Inc. (USA) の CASE Ultra を用いてエームス試験結果の QSAR 予測計算を行った。このうち 58 化合物は両者の QSAR モデルで陽性と判断され、変異原性が疑われた。本年度はこのうち試験データのない 10 化合物に関しては実際にエームス試験を行い、変異原性の有無を検証した。

B . 研究方法

B.1. エームス試験対象物質

2 つの QSAR モデルで陽性を示した 58 化合物のうち、以下の 6 化合物を今年度のエームス試験対象物質とした。

- 4-メチル-2-ペンテナール
- 4'-メトキシシナミルアルデヒド
- 3-アセチル-2,5-ジメチルフラン
- 2,5-ジメチル-4-オキシ-3(5H)-フリルアセテート
- 4-メトキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-フラノン
- フルフリルフォルメート
- メチル -フェニルグリシデート
- 2-[(メチルチオ)メチル]-2-ブテナール

2-メチルキノリン

6-メトキシキノリン

* 10 化合物の内 4 化合物は本研究費予算で実施した。残り 6 化合物については食検費で行った。この 6 化合物のエームス試験結果については、厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)食品添加物の安全性確保のための研究(H28-食品-一般-001)」でも報告した。

B.2. エームス試験

エームス試験は全て外部委託より CRO が実施した。OECD 試験ガイドライン TG471 に準拠し、細菌を用いる復帰突然変異試験(Ames Test)を実施した。本試験はアミノ酸要求性のサルモネラ菌と大腸菌の株を用いて点変異を検出し、被験物質が DNA に影響を与えるか否かの判定する試験である。試験は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」(平成 8 年 3 月 22 日付、衛化第 29 号生活衛生局長通知)に準拠し、医薬品医療機器法施行規則第 43 条「申請資料の信頼性の基準」に基づいて実施した。

C . 研究結果

エームス試験実施 10 化合物の QSAR 予測結果を表 1 に示す。2,5-ジメチル-4-オキシ-3(5H)-フリルアセテート、4-メトキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-フラノン、フルフリルフォルメートは Case Ultra の旧バージョンではそれぞれ PHARM_SALM、PHARM_SALM、GT1_AT_ECOLI のモジュールで陽性とされたが、今回の新バージョン(ver. 1.7.0.5)の統合型モジュール(GT1_BMUT)ではそれぞれ陰性、陰性 inconclusive と判定された。評価するアラーと構造が変化したことによる計算結果の違いと考えるが、後述するように実際のエームス試験では 2 化合物で陽性だったことを考えると、この改良は一部有効ではなかったと考える。

表 1 にエームス試験結果を示す。10 化合物中 9 化合物において陽性の結果が得られた。特に、4-メチル-2-ペンテナール、3-アセチル-2,5-ジメチルフラン、6-メトキシキノリンの 3 化合物は

比活性値が 1000 以上を示す強い陽性反応を示した。

脂肪族高級アルデヒド類の 4-メチル-2-ペンテナールと 2-[(メチルチオ)メチル]-2-ブテナールは、 α -不飽和カルボニル構造を持つ。 α -不飽和カルボニル化合物は DNA との種々の相互作用を受け、異なる遺伝毒性や変異原性反応に至る可能性がある。環状付加体の形成、フレームシフト変異、鎖切断、および交差結合などの遺伝毒性メカニズムが考えられる。直接的な相互作用に加えて、代謝的エポキシ化やラジカルの生成などその他の代謝活性化経路が予測される。 α -不飽和カルボニル化合物と DNA 構成成分との主な相互作用は、環状 1,N2-デオキシグアノシン付加体の形成である。この反応はデオキシグアノシンの環外窒素に対する初期マイケル型付加を通じて発生し、その後閉環して 8-ヒドロキシプロパノ付加体が形成される。

2,5-ジメチル-4-オキソ-3(5H)-フリルアセテートと フルフリルフォルメートはエステル類に分類されるが、変異原性は二重結合のエポキシ化が関与していることが予想される。同様に、エステル類である メチル α -フェニルグリシデートはエポキシ構造を有し変異原性が予測される。以上の変異原性は代謝活性化を必要とせず発揮される。2,5-ジメチル-4-オキソ-3(5H)-フリルアセテートの類似化合物である (アセテートが水酸基に置き換わったもの) 4-ヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-フラノン(DMHF)はエームス試験陽性ではあるが DEREK と MCASE では陰性予測されたと報告されている (Ono et al., Food & Chem Tox, 50,1538-1546, 2012)。今回も CASE Ultra では陰性予測であった。QSAR 予測はわずかなトレーニングデータにより変わる可能性がある。フラン類の変異原性の予測には注意が必要である。

芳香族アルデヒド類の 4'-メトキシシナミルアルデヒドは弱い変異原性を示した。これも二重結合のエポキシ化が関与していることが予想される。本香料は Phase II 酵素である硫酸転移

酵素により硫酸抱合体となり、その後硫酸基が解離してカルボニウムイオンが生じる可能性がある。従って、変異原性は Phase II 酵素が働く *in vivo* の方が強く表れる可能性があることに注意すべきである。

2-メチルキノリンと、6-メトキシキノリンは代謝活性化による 3,4 位が主な代謝経路と考えられている。結果として開環代謝物が DNA と共有結合することにより変異原性を発揮する。6-メトキシキノリンはキノリンより変異原性が強いことが予測される。これは 6 位のメトキシ基が変異原性増強アラートであるためである。2-メチルキノリンのメチル基も変異原性増強アラートであることを考えると、その変異原性は 6-メトキシキノリンとキノリンの中間程度と予測される。

ケトン類に分類される 3-アセチル-2,5-ジメチルフランは強い陽性を示したが、その理由は不明である。DEREK Nexus では Equivocal の予測で有り、CASE Ultra でも予測可能性は 23%である。一方、4-メトキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-フラノンは唯一陰性を示した。本化合物は 2,5-ジメチル-4-オキソ-3(5H)-フリルアセテートの類似化学物質であり、アセテート基と、メトキシ基の違いだけである。一般にメトキシ基の方が変異原性増強アラートと考えられるため、この結果は矛盾している。先にも述べたが、フラン類の変異原性の予測と評価には高度の専門家判断が必要と考えられる。

E. 結論

2 つの QSAR 用いてエームス変異原性が強く疑われた 10 種類の食品香料について実際のエームス試験を実施したところ、9 化合物で陽性を示した。特に 4-メチル-2-ペンテナール、3-アセチル-2,5-ジメチルフラン、6-メトキシキノリンの 3 化合物は強い変異原性を示した。これら香料の安全性確保のためには、ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験、*in vivo* トランスジェニックマウス遺伝子突然変異等の上位試験によりその変異原性を検証する必要がある。また、今回 QSAR による

変異原性香料物質の陽性予測率は90%(9/10)と評価された。この結果は香料の変異原性評価にQSAR手法が十分に利用できることを示している。

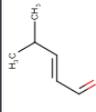
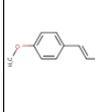
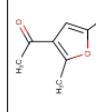
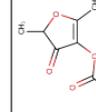
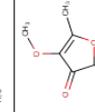
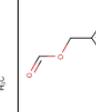
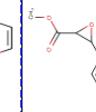
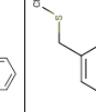
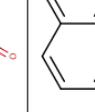
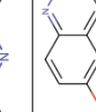
F. 研究発表

誌上発表

1. Gadaleta D, Porta N, Vrontaki E, Manganelli S, Manganaro A, Sello G, Honma M, Benfenati E. Integrating computational methods to predict mutagenicity of aromatic azo compounds. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2017, 35(4):239-257. doi: 10.1080/10590501.2017.1391521.
2. Amberg A, Andaya RV, Anger LT, Barber C, Beilke L, Bercu J, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cross KP, Custer L, Dobo K, Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Gomez S, Van Gompel J, Harvey J, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kemper R, Kenyon M, Kruhlak N, Leavitt P, Miller S, Muster W, Naven R, Nicolette J, Parenty A, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Sasaki JC, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, Weiner S, Welch DS, White A, Wichard J, Woolley D, Myatt GJ. Principles and procedures for handling out-of-domain and indeterminate results as part of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018, S0273-2300(18)30314-3. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.12.007.
3. Myatt GJ, Ahlberg E, Akahori Y, Allen D, Amberg A, Anger LT, Aptula A, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Burden N, Cammerer Z, Cronin MTD, Cross KP, Custer L, Dettwiler M, Dobo K, Ford KA, Fortin MC, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gervais V, Glover KP, Glowienke S, Van Gompel J, Gutsell S, Hardy B, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Hughes K, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kim MT, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Majer B, Masten S, Miller S, Moser J, Mumtaz M, Muster W, Neilson L, Oprea TI, Patlewicz G, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Ruiz P, Schilter B, Serafimova R, Simpson W, Stavitskaya L, Stidl R, Suarez-Rodriguez D, Szabo DT, Teasdale A, Trejo-Martin A, Valentin JP, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Hasselgren C. In silico toxicology protocols. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018, 96:1-17. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.04.014.
4. Mishima M, Hashizume T, Haranosono Y, Nagato Y, Takeshita K, Fukuchi J, and Homma M. Meeting report, ICH M7 relevant workshop: use of (Q)SAR systems and expert judgment. *Genes and Environment* (2018) 40:19. doi.org/10.1186/s41021-018-0107-2
5. Benfenati E, Golbamaki A, Raitano G, Roncaglioni A, Manganelli S, Lemke F, Norinder U, Lo Piparo E, Honma M, Manganaro A, Gini G. A large comparison of integrated SAR/QSAR models of the Ames test for mutagenicity(S). *SAR QSAR Environ Res.* 2018, 29(8):591-611. doi: 10.1080/1062936X.2018.1497702.
6. Honma M, Kitazawa A, Cayley A, Williams RV, Barber C, Hanser T, Saiakhov R, Chakravarti S, Myatt GJ, Cross KP, Benfenati E, Raitano G, Mekenyan O, Petkov P, Bossa C, Benigni R, Battistelli CL, Giuliani A, Tcheremenskaia O, DeMeo

- C, Norinder U, Koga H, Jose C, Jeliaskova N, Kochev N, Paskaleva V, Yang C, Daga PR, Clark RD, Rathman J. Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity: outcomes of the Ames/QSAR International Challenge Project. *Mutagenesis*. 2019, 34(1):3-16. doi:10.1093/mutage/gey031.
7. Fukuchi J, Kitazawa A, Hirabayashi K, Honma M. A practice of expert review by read-across using QSAR Toolbox. *Mutagenesis*. 2019 Mar 6;34(1):49-54. doi:10.1093/mutage/gey046.
 8. Petkov PI, Schultz TW, Honma M, Yamada T, Kaloyanova E, Mekenyan OG. Validation of the performance of TIMES genotoxicity models with EFSA pesticide data. *Mutagenesis*. 2019, 34(1):83-90. doi: 10.1093/mutage/gey035.
 9. Tennant RE, Guesné SJ, Canipa S, Cayley A, Drewe WC, Honma M, Masumura K, Morita T, Stalford SA, Williams RV. Extrapolation of in vitro structural alerts for mutagenicity to the in vivo endpoint. *Mutagenesis*. 2019, 34(1):111-121. doi: 10.1093/mutage/gey030.
 10. Morita T, Shigeta Y, Kawamura T, Fujita Y, Honda H, Honma M. In silico prediction of chromosome damage: comparison of three (Q)SAR models. *Mutagenesis*. 2019, 34(1):91-100. doi: 10.1093/mutage/gey017.
 11. Amberg A, Anger LT, Bercu J, Bower D, Cross KP, Custer L, Harvey JS, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Leavitt P, Quigley DP, Miller S, Snodin D, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, White AT, Wichard J, Myatt GJ. Extending (Q)SARs to incorporate proprietary knowledge for regulatory purposes: is aromatic N-oxide a structural alert for predicting DNA-reactive mutagenicity? *Mutagenesis*. 2019, 34(1):67-82. doi: 10.1093/mutage/gey020. PubMed PMID: 30189015; PubMed Central PMCID: PMC6402318.
- 学会発表
1. 本間正充、医薬品中の変異原性不純物の安全性評価と管理 口演、2018年 ISPE 日本支部年次大会、2018/5/24、国内
 2. 本間正充、Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity 口演、QSAR2018、2018/06/12、ブレット・スロベニア
 3. 本間正充 遺伝毒性の新たな動き 口演 第45回日本毒性学会学術年会、2018/7/20、国内
 4. 本間正充、Mutagens and carcinogens in Japanese food: evolution of prioritized risk 口演、第49回米国環境変異ゲノミクス学会、2018/9/26、サンアントニオ・米国
 5. 本間正充、(QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity 口演、KNect365 Life Sciences Annual Meeting of Genotoxic Impurities、2018/10/24、ベルリン・ドイツ
 6. 本間正充、(QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity and its application to risk assessment 口演、2018 Joint International Workshop "Progress of Genotoxicity Methods and Regulatory Acceptance、2018/11/27、広州・中国
- G . 知的財産権の出願・登録状況**
なし

表1 香料(10)のQSARによるエームス変異原性予測とエームス試験結果

ID	Page No.	chemical name	Structure	日本の類指定	SMILES	CAS#	Derek Nexus	CASE Ultra GT1_BMUT (新規香料ベームス主ジェーブル統合型)	CASE Ultra GT1_BMUT Probability (%)	エームス試験結果
1	3251	4-methyl-2-pentenal (4-メチル-2-ペンタナール)		脂肪族高級アルデヒド類	CC(C)\C=C\C=O	5362-56-1	PLAUSIBLE	Positive	70.9	TA100でS90の有無に係わらず陽性 最大比活性値:1340(TA100,-S9) 代謝活性化が必要としない強い陽性
2	2658	4'-methoxycinamaldehyde (4'-メトキシシナミルアルデヒド)		芳香族アルデヒド類	COc1ccc(\C=C\C=O)cc1	1963-36-6	PLAUSIBLE	Positive	79.7	TA1000+S9で再活性のある弱い陽性(1.6倍) 代謝活性化を必要とする陽性と判定する
3	99	3-acetyl-2,5-dimethylfuran (3-アセチル-2,5-ジメチルフラン)		ケトン類	CC(=O)c1cc(C)c(C)c1C	10599-70-9	EQUIVOCAL	Known Positive	22.9	TA1000の+/S9, WP2uvrAの-S9, TA980の-S9で陽性 最大比活性値:1281(強い陽性):TA100,-S9 代謝活性化を必要とせず強い陽性
4	1082	2,5-dimethyl-4-oxo-3(5H)-furyl acetate (2,5-ジメチル-4-オキシ-3(5H)フリルアセテート)		エステル類	CC1OC(C)C(=O)C1=O	4166-20-5	PLAUSIBLE	Negative	31.7	TA1000でS90の有無に係わらず陽性 最大比活性値:77(TA100,+S9) 代謝活性化を必要としない陽性
5	2662	4-methoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (4-メトキシ-2,5-ジメチル-3(2H)フラノン)		ケトン類	COc1c(C)OC(C)C1=O	4077-47-8	PLAUSIBLE	Negative	22.9	陽性
6	1700	furfuryl formate (フルフリルフォルメート)		エステル類	O=C.Oc1ccco1	13493-97-5	EQUIVOCAL	Inconclusive	40.6	TA100, TA980ではS9の有無に係わらず陽性 WP2uvr2では-S9で陽性 最大比活性値:396(TA100,-S9) 代謝活性化を必要とせず陽性
7	2899	methyl beta-phenylglycidate (メチルβ-フェニルグリシデート)		エステル類	COc1c(O)C1OC1C1C1C1C1	37161-74-3	PLAUSIBLE	Known Positive	44.6	TA100, WP2uvr2でS90の有無に係わらず陽性 最大比活性値:84(TA100,-S) 代謝活性化を必要とせず陽性
8	3489	2-[(methylthio)methyl]-2-butenal (2-[(メチルチオ)メチル]-2-ブテナール)		脂肪族高級アルデヒド類	CS(C)C(=C)C=O	4087-72-6	PLAUSIBLE	Positive	66.9	TA100, WP2uvr2でS90の有無に係わらず陽性 最大比活性値:225(TA100,-S) 代謝活性化を必要とする陽性
9	3378	2-methylquinoline (2-メチルキノリン)		(日本では香料物質に該当しない化合物)	Cc1ccc2cccnc21	91-63-4	PLAUSIBLE	Known Positive	76.8	TA1000+S9で再活性のある弱い陽性 最大比活性値:604(TA100,+S9) 代謝活性化を要する陽性
10	2731	6-methoxyquinoline (6-メトキシキノリン)		エーテル類	COc1ccc2ncccc2c1	5263-87-6	PROBABLE	Known Positive	68.3	全ての菌株の+S9で再活性のある強い陽性 最大比活性値:5117(TA100,-S9) 代謝活性化を要する強い陽性

平成 30 度 厚生労働科学研究費（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

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

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

分担研究者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

Ames 試験陽性の結果は、医薬品等の開発に大きな影響を与え、適切なフォローアップが必要となるが、*in vivo* トランスジェニック試験は負担が大きいと考えられる。少なくともその陽性反応がバクテリア特異的反応である場合、ヒトへの外挿性が低いことを証明し、無駄な *in vivo* 試験を避けることができる可能性がある。Ames 試験陽性の非発がん性物質を、ほ乳類細胞を用いた遺伝毒性試験（チミジンキナーゼ遺伝子(TK)変異試験）でフォローアップし、ほ乳類細胞でも同様に変異原性を示すかどうかを検証すべきと考えられる。よって、本年度ではデータベースから抽出された Ames 試験陽性の非発がん性 10 物質について TK 変異試験を実施するために、共同研究組織を立ち上げ、その TK 変異試験のプロトコールの評価と共有化を行った。また、暫定的ではあるが、その試験結果の一部を報告する。共同研究組織で使用する実験プロトコールを共有化することによって、安定したデータが得られた。10 物質中 4 物質の暫定結果が得られ、その 4 物質中の 3 物質が陽性であった。その結果は、Ames 試験と一致率が高く、発がん性試験の結果とは一致しなかった。暫定的ではあるが、TK 変異試験が Ames 試験陽性のフォローアップ試験として十分かは不確実である。

キーワード:チミジンキナーゼ遺伝子変異試験、Ames 試験、フォローアップ試験

A . 研究目的

Ames 試験陽性の結果は、医薬品等の開発に大きな影響を与え、適切なフォローアップが必要となるが、*in vivo* トランスジェニック試験は負担が大きいと考えられる。少なくともその陽性反応がバクテリア特異的反応である場合、ヒトへの外挿性が低いことを証明し、無駄な *in vivo* 試験を避けることができる可能性がある。一方、Ames 試験と発がん性の特異性（Specificity; Ames 試験陰性で発がん性陰性）は 80%程度で有り（Kirkland *et al.*, *Mutat Res* 584,

1-256 (2005)）。これは Ames 試験陽性で発がん性陰性であるものは比較的少ないことを示している。それでも、バクテリア特異的な陽性反応であり、ヒトの発がんとは無関係なものは存在する。バクテリア特異的な陽性反応として、AMP397 で報告されるようなバクテリア特異的ニトロリダクターゼ反応がある（Suter *et al.*, *Mutat Res* 518, 181-194 (2002)）。この酵素が Ames 試験の変異原性に強く関与する場合、他の遺伝毒性試験では陰性を示すことが多く、発がん性のリスクは低い。

実際に、Ames 試験陽性で発がん性陰性の物質にはニトロ芳香族や芳香族アミン類が多いことが知られている。しかしながら、ニトロ芳香族、芳香族アミン類の中には発がん性を示すものも多く存在している。このように、同じ Ames 試験陽性でありながら、何故発がん性の有無に違いがあるのかは不明である。つまり、Ames 試験陽性の非発がん性物質を、ほ乳類細胞を用いた遺伝毒性試験（チミジンキナーゼ遺伝子(TK)変異試験）でフォローアップし、ほ乳類細胞でも同様に変異原性を示すかどうかを検証すべきと考えられる。よって、本年度ではデータベースから抽出された Ames 試験陽性の非発がん性物質のうち、10 物質について TK 変異試験を実施するために、共同研究組織を立ち上げ、その TK 変異試験のプロトコルの評価と共有化を行った。また、暫定的ではあるが、その試験結果の一部を報告する。

B．研究方法

1．共同研究組織の構築

Ames 試験陽性の非発がん性物質（10 物質；表 1 参照）が多数におよぶため、日本環境変異原学会の分科会である MMS 研究会で共同研究を提案した。キックオフ会議を行い、共同研究組織を立ち上げ、TK 変異試験を分担するために各施設で担当する物質を決定した。

表 1．非発がん性であるにも関わらず Ames 試験陽性の物質

No.	物質名	CAS No.
1.	4-(Chloroacetyl)-acetanilide	140-49-8
2.	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	6959-47-3
3.	2,6-Diaminotoluene	823-40-5
4.	2,5-Diaminotoluene	95-70-5
5.	HC blue no.2	33229-34-4
6.	8-Hydroxyquinoline	148-24-3
7.	Iodoform	75-47-8
8.	4-nitroanthranilic acid	619-17-0

9.	1-Nitronaphthalene	86-57-7
10.	4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-9

2．TK 変異試験プロトコルの評価と共有化
共同研究で使用する TK 変異試験の実験プロトコルは、OECD ガイドライン TG-490（チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験）に基づくが、より実験施設間のデータばらつきを最小にするために、実験条件や操作方法をさらに確認・評価し、共同研究組織内で現実的に利用できる実験プロトコルを共有化した。

C．研究結果

1．共同研究組織

非発がん性であるにも関わらず Ames 試験陽性を示す 10 物質について、TK 変異試験でフォローアップ試験をする共同研究組織を構築した。製薬会社、総合化学メーカー、および CRO 会社など下記の計 10 社の参加が決定した。

- ・ボゾリサーチセンター
- ・日本たばこ産業
- ・イナリサーチ
- ・CERI
- ・アステラス製薬
- ・ヤクルト本社
- ・中外製薬
- ・帝人ファーマ
- ・LSI メディエンス
- ・安評センター

2．本共同研究で使用する TK 変異試験プロトコル

共同研究組織内の実験プロトコルは、おもに各共同研究施設の SOP で実施してよいが、少なくとも次の実験操作について確認し、共有化した。

2 - 1．細胞と培養

TK6 細胞を購入する際は、JCRB 細胞バンク

より購入する。細胞は、10% 馬血清 (JRH Bioscience; ロット#16J196 を用いる) 200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン (メーカー問わず) を含む RPMI 培地 (メーカー問わず) で培養する (37 度、5% CO₂)。

2 - 2 . 被験物質の処理方法

被験物質の処理は、表 2 に示した方法を参考にして実施する。細胞液の濃度や容量は適宜変更して構わないが、処理する細胞数は 2×10^7 cells とする。被験物質を注射用水 (メーカー問わず) あるいは DMSO (メーカー問わず) で溶解後、S9mix (オリエンタル酵母工業(株)) の存在下、あるいは非存在下 (150 mM KCl) において、対数増殖期にある TK6 細胞に暴露し、4 時間培養する。処理中の振とう・非振とうは、結果への影響が少ないため施設の自由とする。

用量設定試験は、陰性対照と被験物質は 1 系列で行い、陽性対照は実施しない。本試験は、陰性対照は 2 系列、被験物質は 1 系列で行う。陽性対照物質は、表 3 に示したように、代謝活性化条件ではシクロホスファミド (CP)、非代謝活性化条件ではメタンサルホン酸メチル (MMS) の製品と製造ロットを使用する。

被験物質の処理後、遠心分離し、上清を除去後、無血清培地で細胞を洗浄する。遠心分離の条件は、例えば 1000 rpm、5 分間で実施する。再度、その細胞懸濁液を遠心分離し、上清を除去後、10% 血清を含む培地 50 ml で細胞を分散させ細胞濃度を測定する。その 50 ml (濃度約 4×10^5 cells/ml) の処理細胞は、37 度、5% CO₂ で培養を開始し、TK 変異試験に用いる。それとは別に、平板効率 Cloning Efficiency (CE) を計算するため (式 1)、約 1.6 cell/ウェルの濃度で 96 ウェルマイクロプレートで 2 週間培養する。

表 2 . 被験物質の処理例

細胞液(約 4×10^6 cells/mL)	5 mL
RPMI-0 (無血清培地)	3.3 mL

S9 mix あるいは 150 mM KCl	1.5 mL
被験液	0.2 mL
処理容量	10 mL

表 3 . 陽性対照物質の情報

非代謝活性化	名称：メタンサルホン酸メチル(MMS) ロット番号：M0369 製造元：東京化成工業株式会社 製品コード：M0369
代謝活性化	名称：シクロホスファミド水和水物(CP) ロット番号：PTR2478 製造元：和光純薬工業株式会社 販売コード：030-12953

2 - 3 . 細胞相対生存率の測定

細胞のコロニー形成率である CE は、ポアソン分布の式に従い、式 1 を用いて算出する。EW は、コロニーを含まないウェル数であり、TW は総ウェル数である。N は、1 ウェル当たりの平均細胞数 (N = 1.6 で実施) である。

$$CE = -\ln(EW / TW) / N \quad \dots (式 1)$$

また、暴露処理中の細胞毒性が強い場合など、細胞数消失があるため、次の計算式 (式 2) で CE を補正する。“処理終了時の細胞数” は、前述の「2 - 2 . 被験物質の処理方法」において処理終了時の遠心分離後に得られた細胞数である。“処理開始時の細胞数” は、 2×10^7 cells (表 2) である。

$$\text{補正 CE} = CE \times \text{処理終了時の細胞数} / \text{処理開始時の細胞数} \quad \dots (式 2)$$

TK 変異試験では、細胞生存率を調べるために、処理直後に細胞を播く CE0 播種、および処理してから 3 日後に細胞を播く CE3 播種がある。被験物質で処理された直後の細胞相対生存率 RS0 (%) は、CE0 から算出され、次の式 3 で

計算する。陰性対照（注射用水）の生存率を 100 % と定義する。なお、細胞毒性がある場合、RS0 = 20 ~ 10% の用量を最高用量として設定する。

なお、RS0 = 20 ~ 10% で細胞毒性が強い、あるいは再現性が低い等で試験続行が困難な場合は、後述する RTG = 20 ~ 10% となる用量を最高用量として TK 変異試験を実施してもよい。

$$RS0 (\%) = \text{処理培養の補正 CE0} / \text{溶媒対照の補正 CE0} \times 100 \quad \dots (式 3)$$

2 - 4 .TK 変異試験、および細胞毒性指標 RSG と RTG) の測定

前述の細胞相対生存率 RS0 の他に、被験物質処理による細胞毒性の指標として、式 4 に示す Relative Suspension Growth (RSG) と Relative Total Growth (RTG) を算出する。被験物質を処理後、細胞を 3 日間培養する。その際に、浮遊細胞増殖比 1 (SG1) は、0 日目から 1 日目の増殖比 (1 日目の細胞濃度 / 0 日目の細胞濃度) で、浮遊細胞増殖比 2 (SG2) は 1 日目から 2 日目の増殖比 (2 日目の細胞濃度 / 1 日目の細胞濃度) である。RSG は無処理 / 溶媒対照に対する処理培養の総 SG (SG1 × SG2 × SG3) である (式 4)。

RTG は、式 5 で示したように、RSG と RS3 (式 3 と類似) の積で算出する。

$$RSG = \frac{[SG1(\text{処理}) \times SG2(\text{処理}) \times SG3(\text{処理})]}{[SG1(\text{対照}) \times SG2(\text{対照}) \times SG3(\text{対照})]} \quad \dots (式 4)$$

$$RTG (\%) = RSG \times \%RS3 \quad \dots (式 5)$$

$$RS3 (\%) = \text{処理培養の CE3} / \text{溶媒対照の CE3} \times 100 \quad \dots (式 6)$$

培養 3 日目では、平板効率を求めるための CE3 プレート (CE0 と同様に細胞の CE3 播種を

行う) と突然変異体検出用の Mutant Frequency (MF) プレートを作成する。MF プレートは、TFT 試薬 3 µg/ml の存在下で、1 ウェルあたり 40,000 細胞になるように 96 ウェルマイクロプレートに播種する。

生育したコロニーを含むウェルは、培地の色が赤色から黄色に明らかに変わるため、その色調変化でコロニーの有無 (EW) をカウントする。CE0 と CE3 プレート、および TFT を含む MF プレートは細胞播種してから 14 日後にコロニーを観察する。培地に色調変化のあったウェルのコロニーを NG 変異コロニー (Normally Growing Mutant Colonies) としてカウントする。また、その MF プレートの各ウェルに 30 µg/mL TFT 試薬を 25 µL ずつ再添加し、さらに 14 日間培養する。細胞播種してから計 28 日後、先と同様に培地の色調変化によって生育コロニーを観察し、それを SG 変異コロニー (Slowly Growing Mutant Colonies) としてカウントする。

MF プレートの突然変異コロニーは、ポアソン分布に従い、式 7 を用いて算出する。EW は、コロニーを含まないウェル数であり、TW は総ウェル数である。N は、1 ウェル当たりの平均細胞数 (本実験では N = 40,000) である。

MF は、下記のように総遺伝子突然変異頻度 (T-MF)、NG コロニーの遺伝子突然変異頻度 (N-MF)、SG コロニーの遺伝子突然変異頻度 (S-MF) の 3 つを算出できる。

$$MF = [-\ln (EW / TW) / N] / \text{処理培養の CE3} \quad \dots (式 7)$$

$N\text{-MF}; EW_N = 192 - A$
 $TW_N = 192$
 $S\text{-MF}; EW_S = (192 - A) - B$
 $TW_S = 192 - A$
 $T\text{-MF}; EW_T = 192 - (A + B)$
 $TW_T = 192$
 (192 個のウェルのうち 14 日後の観察で NG コロニーを含むウェルが A 個、28 日後の観察時に SG コロニーのみを含むウェルが B 個出現したとする)

2 - 5 . 統計解析方法

TK 変異試験の本試験は、陰性対照を 2 系列、被験物質を 1 系列で行うため、大森法(Omori *et al.*, *Mutat Res* 517, 199-208 (2002))を用いる。

3 . 進捗状況

途中段階であるが、上の実験プロトコールを使用して TK 変異試験した暫定的な結果(10 物質中 4 つ)を表 4 に示した。4-(Chloroacetyl)-acetanilide は陰性であったが、残りの 3 物質(2-(Chloromethyl)pyridine HCl、HC blue no.2、4-nitroanthranilic acid)は、陽性であった。その他の物質は、実験中である。

表 4 . Ames 試験陽性の非発がん性物質に対する TK 変異試験(暫定結果)*

No.	物質名	短時間処理		長時間処理
		-S9	+S9	
1.	4-(Chloroacetyl)-acetanilide	陰性	陰性	陰性
2.	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	陽性	陽性	未実施
3.	2,6-Diaminotoluene	-	-	-
4.	2,5-Diaminotoluene	-	-	-
5.	HC blue no.2	陰性	陰性	陽性
6.	8-Hydroxyquinoline	-	-	-
7.	Iodoform	-	-	-

8.	4-nitroanthranilic acid	陰性	陰性	陽性
9.	1-Nitronaphthalene	陰性	陰性	-
10.	4-Nitro-o-phenylene diamine	-	-	-

*表中の” - ”は実験中であることを示す

D . 考 察

データベースから得られた非発がん性であるにも関わらず Ames 試験陽性の物質は、実際には 10 物質以上見つかったが、購入が不可能なこと、常温で気体であることなど、TK 変異試験を実施するのに困難な物質があったため、除外した。

TK 変異試験のヒストリカルデータについて、国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部、およびヒストリカルデータを有する共同研究機関のデータを総合して、陽性対照群の T-MF 値の範囲を計算した。その結果、各陽性対照物質の T-MF 値は、非代謝活性化条件(4 時間処理)の MMS 処理(2.5 ~ 3 μg/ml)では 6 ~ 26 × 10⁻⁶ の範囲、そして、代謝活性化条件(4 時間処理)の CP 処理(2.5 ~ 3 μg/ml)では 7 ~ 22 × 10⁻⁶ の範囲、長時間処理の MMS 処理(2.5 ~ 3 μg/ml)では 13 ~ 52 × 10⁻⁶ の範囲であることが分かった。これら突然変異頻度の範囲値を利用して、共同研究で実施する TK 変異試験の成立条件として応用することにした。

TK 変異試験で陽性だった 3 物質(2-(Chloromethyl)pyridine HCl、HC blue no.2、4-nitroanthranilic acid)のうち、HC blue no.2 と 4-nitroanthranilic acid は、短時間処理(+/-S9mix)で陰性であったが、S9mix を添加しない長時間処理では陽性となった。つまり、4 時間処理では陰性だが、24 時間処理では陽性であり、その原因は現段階では不明である。おそらく長時間処理による酸化ストレス、あるいは被験物質の分解物による DNA 損傷の増加などが TK 遺伝子の変異頻度を上昇させた可能性が考えられた。

E. 結 論

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

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 安井学, 鵜飼明子, 福田隆之, 馬庭二郎, 山

本春菜, 今村匡志, 藤島沙織, 大谷尚子, 成見香瑞範, 松崎香織, 岡田祐樹, 中川宗洋, 上田摩弥, 小川久美子, 本間正充: Ames 試験陽性のフォローアップに関するチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験の有用性の検討: MMS 共同研究の報告. 日本環境変異原学会第47回大会(2018.11.2)

2) 竹入章, 松崎香織, 田中健司, 小川久美子, 安井学, 本間正充, 三島雅之: Ames 試験陽性のフォローアップとしての TK6 細胞を用いた γ H2AX 評価系の有用性検討; MMS 共同研究オプション項目の報告. 日本環境変異原学会第47回大会(2018.11.1)

H. 知的所有権の取得状況

なし

平成 30 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究課題名：AOPと定量的評価を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化

研究分担者：増村健一 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
協力研究者：安東朋子 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

総合型遺伝毒性発がんリスク評価法を確立するため、OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法（AOP）」を取り入れた遺伝毒性評価系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指すとともに、遺伝毒性の定量的な評価に取り組むことを目的とする。化学物質によって誘発される DNA 初期損傷（DNA 付加体形成）と遺伝子突然変異の量的相関を明らかにするため、食品に含まれる遺伝毒性発がん物質であるアクリルアミド（AA）をモデル化合物として、雄 C57BL/6J *gpt delta* マウスを用いた飲水投与実験を実施した。AA は 300, 100, 30 ppm の用量で 28 日間飲水投与し、最終投与 3 日後に組織を採取し凍結保存した。最高用量 300 ppm 群では顕著な体重増加抑制が見られたことから、300 ppm が最大耐用量付近と考えられた。飲水量から換算した AA 摂取量は 30, 100, 300 ppm 群でそれぞれ 4.32 ± 0.2 、 16.2 ± 0.6 、 37.4 ± 0.6 mg/kg/day であった。肝臓、肺、精巣からゲノム DNA を調製し、質量分析装置（LC-MS/MS）を用いて DNA 付加体量の測定を行った。AA はグリシドアミドに代謝されてグアニン塩基と結合し DNA 付加体を形成することから、代表的な付加体の一つである N7-GA-Gua 付加体を測定した。肝臓、肺、精巣のいずれにおいても AA 用量依存的に N7-GA-Gua 付加体量は増加した。用量反応関係はほぼ直線的であり、組織による明らかな感受性の差は認められなかった。直線近似から求めた AA 1 mg/kg/day あたりの N7-GA-Gua 付加体量は 60 ~ 75 個/ 10^8 塩基であった。AA 飲水投与による DNA 付加体形成量は AA 用量依存的であり組織によって顕著な差がないことが示唆された。

キーワード: DNA 付加体, アクリルアミド, *gpt delta* マウス

A. 研究目的

本研究では、香料化学物質の安全性を階層的に評価する評価系を構築し、食品香料の効率的且つ信頼性の高い安全性評価の推進に資することを目的とする。OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカ

ニズムを関連づけて説明する手法（AOP）」を取り入れた遺伝毒性評価系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指すとともに、遺伝毒性の定量的な評価に取り組む。化学発がんの分子的初期イベントである DNA 初期損傷（DNA 付加体形成）およびこれに続くキーイベントである

遺伝子突然変異誘発に関して、これらの *in vivo* における量的相関を明らかにするため、トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験 (TGR 試験) を用いたマルチエンドポイント試験を行う。食品に含まれる遺伝毒性発がん物質であるアクリルアミド (AA) は、グリシドアミドに代謝されてグアニン塩基等と結合して DNA 付加体を形成し、遺伝子突然変異を誘発すると考えられている。AA をモデル化合物として、*gpt delta* マウスを用いた飲水投与実験を実施し、体組織における DNA 付加体形成量を測定するとともに、TGR 試験によって遺伝子突然変異頻度を測定し、用量反応関係を比較する。

B . 研究方法

1 . AA 飲水投与実験

雄 9 週齢の *gpt delta* マウス (C57BL/6J) を用いて AA 飲水投与実験を実施した。アクリルアミド (CAS 79-06-1, MW=71.08) (純度 99%, Sigma-Aldrich) を Milli-Q 水に溶解して 300, 100, 30 ppm 溶液に調製し、給水瓶で自由摂取させた。(AA 100 ppm は 1.4 mM に相当する。) 1 群 10~11 匹のマウスを用いて 28 日間の飲水投与を行った。給水瓶は週 1 回交換し、飲水量と体重を毎週測定した。各群 5 匹を DNA 付加体測定および遺伝子突然変異試験用として、投与終了後 3 日目に安楽死させて組織 (肝臓、肺、精巣) を採取し、-80 で凍結保存した。

2 . LC-MS/MS を用いた DNA 付加体測定

2 - 1 . DNA 調製

凍結組織から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を調製した。調製法は以下の点を一部改変して行った。調製時には RNase 処理を行った。Proteinase K 処理は 37 で 3 時間インキュベーションした。最終溶出の溶媒は Milli-Q 水とした。最終標品の DNA 濃度を biospectrometer (eppendorf) または Qubit (Invitrogen) で測定した。

2 - 2 . サンプル処理 (脱塩基処理)

DNA 5 μ g または 10 μ g を Milli-Q 水で希釈した後、内部標準物質 [¹⁵N⁵]N7-GA-Gua 溶液を定量添加した。N7-GA-Gua 付加体を十分に脱塩基させる条件として 37 で 48 時間インキュベーションした。限外ろ過 (Amicon Ultra Ultracel-3K) を行ってサンプルを回収した後、濃縮遠心機で減圧濃縮した。濃縮した標品は粘性のある液状になった。使用時まで -80 で保存し、使用直前に Milli-Q 水に溶解して LC-MS/MS の測定に用いた。また、N7-GA-Gua 検量線作成に用いる標準液を調製した。N7-GA-Gua 標準液 100 nM 原液を Milli-Q 水で希釈して希釈系列を調製し、内部標準物質 [¹⁵N⁵]N7-GA-Gua 溶液と Milli-Q 水で一定量に調製した。標準液は前処理操作をせずに -80 で保存した。前処理サンプルと検量線作成用標準液それぞれに内部標準物質を同量添加していることにより、絶対量の換算が可能になる。

2 - 3 . DNA 付加体測定

LC-MS/MS は Waters 社製の Ultra performance LC Aquity、Quattro Premier XE システムを使用した。測定条件は資料 1 にまとめた。脱塩基処理したサンプルの検出ピーク面積を求め、N7-GA-Gua 標準液を用いて作成した検量線との比較から N7-GA-Gua 付加体濃度を求めた。dsDNA 中の 1bp の平均分子量 =616 として、DNA 中の付加体量を算出した。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規程を遵守し、動物実験委員会の審査と承認を受けて実施した。

C . 研究結果

1 . AA 飲水投与実験

雄 *gpt delta* マウスを用いて AA の 28 日間飲水投与実験を行った。投与 1 週目以降に最高用量 300 ppm 群において体重増加抑制がみられ、投与 2 週目以降は 0 ppm 群と比較して有意な体重増加抑制が認められた (図 1)。最高用量 300 ppm 群において、0 ppm 群と比較して飲水量の減少が見られた。飲水量から換算した AA 摂取量は 30, 100,

300 ppm 群でそれぞれ 4.32 ± 0.2 、 16.2 ± 0.6 、 37.4 ± 0.6 mg/kg/day であった。最終投与の 3 日後に組織を採取した。最高用量 300 ppm 群において精巣重量が 0 ppm 群と比較して有意な減少がみられた。DNA 付加体測定および遺伝子突然変異測定のため肝臓、肺、精巣を凍結保存した。

2. LC-MS/MS を用いた DNA 付加体測定

2 - 1. N7-GA-Gua 標準液を用いた検量線と検出感度

N7-GA-Gua 標準液 50 ~ 0 nM の希釈系列を用いて検量線を作成した結果、1.25 nM 以上はピーク検出可能であり、0.63 nM 以下はバックグラウンドノイズによりピークが検出されなかった。従って本実験条件における DNA 付加体検出下限はおよそ 150 ~ 300 個/ 10^8 塩基と考えられた。

3. AA 投与マウス組織における DNA 付加体形成量の測定

DNA 付加体定量法の条件検討のため、肝臓 DNA を抽出する際の RNase 処理の影響を検討した。同じ組織量から調製した DNA 標品を同容量用いて DNA 付加体測定を行った結果、RNase 処理有の標品では付加体量が約 65% に減少した。RNA 画分にも N7-GA-Gua 付加体が存在していると考えられたことから、抽出時に RNase 処理を行った DNA 標品を以降の実験に用いることとした。

AA 300, 100, 30 ppm の用量で 28 日間飲水投与した雄 *gpt delta* マウスの肝臓、肺、精巣についてゲノム DNA を調製し、脱塩基処理を行って、N7-GA-Gua 付加体形成量を測定した。各群 5 匹の組織サンプルについて測定を行った (図 2)。組織 DNA の脱塩基サンプルを用いた際の、本実験条件における DNA 付加体検出下限は約 160 個/ 10^8 塩基であった。

肝臓では、最高用量 300 ppm 投与群における付加体量は 2335 ± 1204 個/ 10^8 塩基であった。肺では、最高用量 300 ppm 投与群における付加体量は 2781 ± 224 個/ 10^8 塩基であった。精巣では、

最高用量 300 ppm 投与群における付加体量は 2886 ± 552 個/ 10^8 塩基であった。用量反応関係はほぼ直線的であり、組織による明らかな感受性の差は認められなかった。陰性対照群の付加体量をゼロとした時の直線近似から求めた AA 1 ppm あたりの付加体形成量は 8 ~ 10 個/ 10^8 塩基であった。飲水量から換算した AA 1 mg/kg/day あたりの付加体形成量は 60 ~ 75 個/ 10^8 塩基であった。

また、一部個体について最終投与後 100 日目に採取した組織について N7-GA-Gua 付加体を測定したところ、肝臓、肺、精巣いずれにおいても付加体のピークは検出されなかった。

D. 考 察

AA は食品に含まれる遺伝毒性発がん物質であり、ヒトおよびげっ歯類において、AA は肝臓のチトクローム P450 (CYP2E1) によって反応性の高い代謝物であるグリシドアミドに代謝される。グリシドアミドは細胞内でヘモグロビン付加体及び DNA 付加体 (N7-dG-GA, N3-dA-GA, N1-dA-GA 等) を形成する。発がん性については、マウスを用いた試験において、ハーダー腺、乳腺、肺、胃等で、ラットを用いた試験において、乳腺、甲状腺、精巣等で発がん頻度の有意な増加がみられている。また、グリシドアミドの試験において、AA と同等の投与量で同様の臓器に発がん性がみられている。従って、AA の発がん AOP としては、分子的初期イベントとして DNA へのグリシドアミド付加体の形成、キーイベントとして遺伝子突然変異の誘発を設定することができる。マウスを用いた AA の 28 日間飲水投与実験を実施して組織サンプルを取得した。最高用量 300 ppm 投与群では体重増加抑制が認められたことから、最大耐用量は 300 ppm と考えられた。DNA 付加体形成量を測定した結果、N7-dG-GA 量は AA 用量依存的にほぼ直線的に増加した。肝臓、肺、精巣において DNA 付加体量に顕著な差はなく、組織が AA 代謝物に全身的に曝露されていることが示された。本実験では OECD が推奨する TGR 試験の標準的プロトコルに従い、28 日間投与の 3 日後に

組織採取しているため、投与終了後の休薬期間に一部の付加体が消失している可能性があるが、この時点であっても AA 投与量と DNA 付加体量の相関性は非常に高く、直線近似式の R^2 値は 0.98 以上であった。一方、最終投与 100 日後には組織中の付加体は検出限界以下であった。N7-dG-GA 付加体は水中で脱塩基が進み DNA から除かれることを反映していると考えられた。脱塩基部位は AP site になるため、付加体の寿命は遺伝子突然変異誘発に影響する要因の一つと考えられる。今後は、DNA 付加体量を測定した同一組織サンプルを用いて TGR 試験を実施し、*gpt* 遺伝子突然変異の用量反応データを取得する。

E . 結 論

AA の発がん AOP を構成する DNA 初期損傷および遺伝子突然変異の用量反応データを取得することを目的に、マウスを用いた 28 日間飲水投与実験を実施した。組織における DNA 付加体形成量を測定した結果、N7-dG-GA 量は AA 用量依存的に増加した。組織の違いによる DNA 付加体量の顕著な差は認められなかった。

F . 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1 . 論文発表

1. You X, Ando T, Xi J, Cao Y, Liu W, Zhang X, Honma M, Masumura K, Luan Y. Gene mutation and micronucleus assays in *gpt* delta mice treated with 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether. *Mutagenesis*. 2018, 33:153-160
2. Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. *In vivo* positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats.

Archives of Toxicology. 2018, 92:3207-3221

3. Aoki Y, Nakajima D, Matsumoto M, Yagishita M, Matsumoto M, Yanagisawa R, Goto S, Masumura K, Nohmi T. Change over time of the mutagenicity in the lungs of *gpt* delta transgenic mice by extract of airborne particles collected from ambient air in the Tokyo metropolitan area. *Genes and Environment*. 2018,40:25
4. Hori H, Shimoyoshi S, Tanaka Y, Momonami A, Masumura K, Yamada M, Fujii W, Kitagawa Y. Integration of micronucleus tests with a gene mutation assay in F344 *gpt* delta transgenic rats using benzo[a]pyrene. *Mutation Research*. 2019, 837:1-7
5. Tennant RE, Guesné SJ, Canipa S, Cayley A, Drewe WC, Honma M, Masumura K, Morita T, Stalford SA, Williams RV. Extrapolation of *in vitro* structural alerts for mutagenicity to the *in vivo* endpoint. *Mutagenesis*. 2019, 34:111-121

2 . 学会発表

1. 増村健一: IWGT 報告 - Aneugen に関する試験 . 日本環境変異原学会 MMS 研究会第 72 回定例会 焼津(2018.6)
2. 増村健一: Ames 試験陽性のフォローアップと *in vivo* 試験 . 日本環境変異原学会 BMS 研究会第 57 回定例会 熱川 (2018.7)
3. 増村健一、安東朋子、豊田尚美、鶴飼明子、能美健彦、本間正充: マウス雄性生殖細胞と次世代個体ゲノムの点突然変異頻度の比較 . 日本環境変異原学会第 47 回大会 京都 (2018.11)
4. 増村健一: 清涼飲料水中の六価クロムの安全性評価について . 第 16 回食品安全フォーラ

△ 東京(2018.12)

5. Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N, Ando T, Ukai A, Nohmi T, Honma M: Absence of selection against ENU-induced point mutations in male germ cells during transmission to the next generation. 49th Annual Meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society. San Antonio, USA. (2018.9)

H. 知的所有権の取得状況

なし

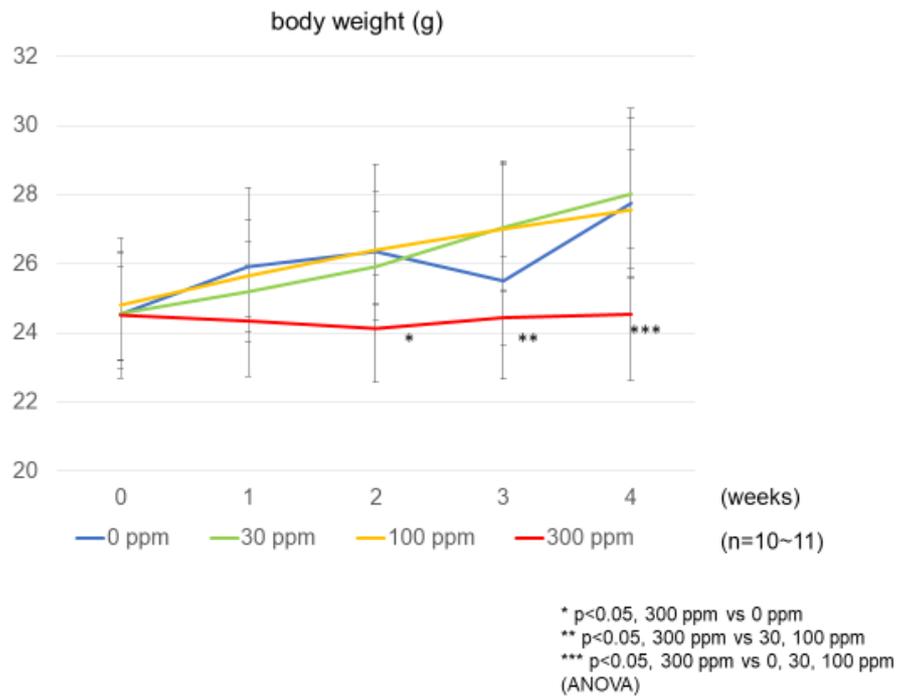


図 1 . 体重推移

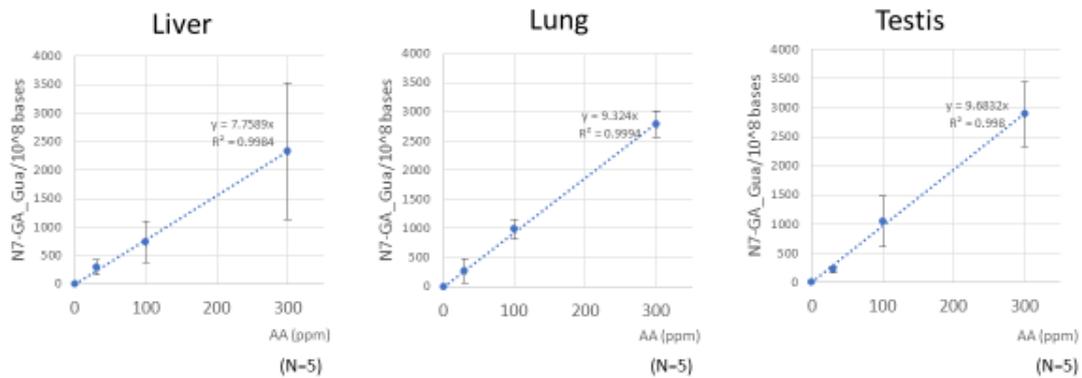


図 2 . AA 投与マウス組織における N7-GA-Gua 付加体量

資料 1 : DNA 付加体測定条件

LC-MS/MS : Ultra-performance LC Aquity、Quattro Premier XE システム (Waters)

HPLC 用カラム : Mightysil RP-18 MS 150-2.0 (5 μ m) (Cat. No 26075-96 関東化学)

移動相 A : Water/ 2 mM ammonium acetate

移動相 B : MeOH/ 2 mM ammonium acetate

Flow rate : 0.2 mL/min

Gradient:

(min)	A (%)	B (%)
0	100	0
10	90	10
11	0	100
20	0	100
21	100	0

Type: MRM

Ion mode: ES+

Capillary (kV)	3.00
Cone (V)	30
Extractor (V)	2
RF Lens (V)	0.0
Source Temperature ()	120
Desolvation Temperature ()	400
Cone Gas Flow (L/Hr)	40
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	500
Collision Cell Pressure (m bar)	< 1e-4
Collision Gas Flow (mL/Min)	0.20

DNA 付加体パラメーター

Adduct	<i>m/z</i>
N7-GA-Gua	239>152
[¹⁵ N ⁵]N7-GA-Gua	244>157

平成 30 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究課題： Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法による評価

研究分担者： 石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
高須伸二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

食品香料として用いられていた acetamide はラット肝発がん性を有する。FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）は，その機序に遺伝毒性機序の関与が否定できないという理由から添加物としての使用は不適切としたものの，種々の遺伝毒性試験は陰性であることから，その関与の有無は明らかになっていない。そこで本研究では，*gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験を用いて，acetamide の包括的評価を実施した。F344 ラットを用いた用量設定試験では，acetamide を 1.25，2.5 及び 5.0% の濃度で 28 日間混餌投与した結果，2.5% 群において血清 AST 及び ALT が有意に上昇し，肝細胞の有糸分裂像，単細胞壊死及び好塩基性の細胞質内封入体とオーバルセルの過形成が認められた。これらの変化は 5.0% 群において減少又は消失し，一般状態の悪化に伴う摂餌量の減少によるものと考えられたため，本試験の最高用量を 2.5% に設定した。本試験では *gpt delta* ラットに acetamide を 0.625，1.25 及び 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与した。その結果，1.25% から肝重量の低下，肝毒性パラメーターの増加が認められた。今後，全身諸臓器の病理組織学的検索を実施し，acetamide の一般毒性及び *in vivo* における変異原性の有無について評価する。

A. 研究目的

合成香料には個別指定品目に加えて，化学構造から使用が認められているいわゆる「18 類」と呼ばれる 3000 を超える品目が例示されている。しかし，その「18 類」の中の一つ 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene は，明確な *in vivo* 遺伝毒性を示すことが明らかとなり，2013 年に欧米および我が国においても使用禁止処置がとられた。また，エストラゴール，メチルオイゲノール，サフロール及びエレミシンといったフェノールエーテル類の天然香気成分が，ラット肝発がん性を有し，その機序に直接的な DNA 損傷を介した突然変異誘発性が関与していることを我々は明らかにしてきた¹⁻⁴⁾。このように，指定対象の香料についてもその安

全性が十分に担保されているとは言えない。国際的な食品添加物の安全性評価委員会である FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）では，香料の評価において，毒性学的懸念の閾値（TTC）と暴露マージン（MOE）を駆使し，多くの場合は実際の試験データを用いずに数多くの香料を評価している。しかしそれは，本来，遺伝毒性がないことが前提とされている。一方，我が国では，90 日間試験と遺伝毒性試験が必須とされてきた。このような違いから，EU 等におけるポジティブリスト制度導入の動きともあいまって，我が国で現在使用されている香料の安全性を可及的速やかに確認する必要がある。

そこで我々は，任意の臓器における *in vivo*

変異原性の検索が可能なレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いることで、同一個体において一般毒性、遺伝毒性及び発がん性に関する情報を短期間で得ることが出来る包括的試験法を開発し、アルコキシベンゼン化合物である香気成分サフロール、メチルオイゲノールおよびエレミシンがラット肝臓において突然変異誘発性及び発がん性を有することをこれまでに明らかにした^{3,4)}。本研究では JECFA で登録されている食品香料または過去に登録されていた香料の中から、ヒト健康影響が懸念される物質について一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価を実施し、ヒトリスク評価に資するデータを提供するとともに、食品添加物の安全性評価における本試験法の有用性を確認することを目的とする。

Acetamide は過去に食品香料として用いられてきたが、ラット肝臓において強い発がん性を有する。その発生頻度の高さから、JECFA は本剤の発がん性に遺伝毒性メカニズムの関与が疑われるとし、食品添加物としての使用は不適切と判断した⁵⁾。一方、遺伝毒性試験では、コメットアッセイにおいて陽性の結果があるものの、Ames 試験及び *in vivo* 小核試験を含む多数の試験においていずれも陰性であることから、その発がん過程における遺伝毒性機序の関与の有無は明らかになっていない。また、acetamide はタバコ煙中や、牛乳、コーヒーといった食品中に含まれることから^{6,7)}、食品を介して非意図的に暴露されており、ヒト健康への影響が懸念されるが、毒性情報は乏しく、ヒトリスク評価に資する情報の取得が喫緊の課題である。

本年度は acetamide について用量設定試験を実施し、本試験における投与量を 0.625、1.25 及び 2.5% に設定した。また、本試験として雄性 6 週齢の F344 系 *gpt delta* ラットに acetamide を 0.625、1.25 及び 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与し、一般毒性評価を開始した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

Acetamide は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。

B-2. 用量設定試験

雄性 6 週齢の F344 ラット 20 匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、CRF-1 粉末基礎飼料(オリエンタル酵母工業株式会社)と水道水で飼育した。動物の飼育はバリアーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時(オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社(東京)のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飼料及び水道水は試験期間中、自由に摂取させた。ラット 20 匹を各群 5 匹に配し、対照群と低、中間及び高用量群の計 4 群を設けた。高用量群では、5.0%、中間用量、低用量群は公比 2 で除した 2.5 及び 1.25% の濃度でアセタミドを粉末飼料に混じり、4 週間自由摂取させた。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施し、体重および摂餌量測定は週 1 回実施した。投与開始から 29 日目にイソフルラン麻酔下にて腹部大動脈より採血し、血清生化学的検査に供した。また、主要臓器(肝臓、腎臓、脾臓および肺)を採取し、重量測定後、10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリンエオジン染色を施した。

B-3. Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験(本試験)

B-3-1 動物実験

動物は 5 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラット 40 匹を日本エスエルシー株式会社(静岡)から購入し、一週間の馴化後、実験に供し

た。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飲料水として水道水を試験期間中自由に摂取させた。40 匹の F344 系 *gpt* dela ラットを各群 10 匹に配し、対照群と低及び高用量群の計 3 群を設けた。Acetamide の投与は用量設定試験の結果に基づいて、高用量を 2.5%、中間用量、低用量群は公比 2 で除した 1.25%、0.625% とし、粉末飼料に混じり、13 週間自由摂取させた。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施し、体重及び摂餌量測定は週 1 回実施した。剖検の 16 時間前より絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。

血液学的検査は、自動血球計数装置 (Sysmex M-2000, 東亜医用電子社, 東京) を用いて、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) 及び血小板数 (PLT) について測定した。

血清生化学的検査は、遠心分離した血清を凍結保存し、総タンパク (TP)、アルブミン・グロブリン比 (A/G)、アルブミン (Alb)、総ビリルビン (T-Bil)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-Cho)、尿素窒素 (BUN)、クレアチン (CRN)、ナトリウム (Na)、塩素 (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスタファターゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ (γ -GTP) について SRL 株式会社 (東

京) にて測定した。

各臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、肺、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、胸腺及び精巣の重量を測定した。上記臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋骨、下垂体、眼球、ハーダー腺、脊髄、唾液腺、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、坐骨神経を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を施し、病理組織学的検索を行った。なお、肝臓の外側左葉の一部は液体窒素により急速凍結して保存し、*in vivo* 変異原性試験 (*gpt* 及び *Spi* assay) に供した。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者が実施し、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルラン麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。実験動物に関しては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組み換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

C. 研究結果

C-1. 用量設定試験

試験期間中、高用量群において一般状態の悪化がみられたものの、途中死亡例は認められなかった。試験期間中の体重の推移を Figure 1A に示す。高用量群では投与 1 週目から対照群に比して体重の有意な低値が認められ、4 週目には低下した。また、中間用量群では有意な差は認められなかったものの、投与開始 1 週目から体重増加抑制が認められた。摂餌量は投与開始 3

週目まで群間の差は認められなかったものの、高用量群では4週目において中間用量群の約半量に低下した (Figure 1B)。

最終体重および主要臓器の重量を Table 1 に示す。最終体重は低用量群から低値が認められ、高用量群では有意な低値を示した。実重量において肺及び脾臓では低用量群から、肝臓及び腎臓では高用量群において有意な低値が認められ、相対重量では肝臓において低用量群から有意な低値が、肺及び腎臓では高値を示した。また、脾臓では低用量群で有意な低値が認められたものの、中間用量群以上で変化は認められなかった。血清生化学検査の結果を Table 2 に示す。1.25%以上の群においてTGの有意な低下が認められた。2.5%以上の群ではTP及びGluの有意な低値が、A/G、T-Bil、ASTの有意な高値が認められた。また、2.5%群においてAlbは有意な低値を、ALT及びALPは有意な高値を示したものの、5.0%群において回復傾向を示した。病理組織学的検索の結果を Figure 2 及び Table 3 に示す。肝臓では2.5%群から肝細胞の単細胞壊死、有糸分裂像及び核の大小不同とオーバルセルの過形成が認められた。また、肝細胞では好塩基性の細胞質内封入体が散見され、これらはフォイルゲン反応に陽性を示した (Figure 3)。また、5.0%群ではオーバルセルの過形成の程度の亢進は認められたものの、その他の変化はいずれも減少又は消失した。

C-2. Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験

試験期間中、動物の一般状態に変化は見られず、途中死亡例も認められなかった。試験期間中の体重の推移を Figure 4A に示す。2.5%群では投与2週目から対照群に比して体重の有意な低値が認められた。一方、摂餌量において群間の差は認められなかった (Figure 4B)。

最終体重および臓器重量を Table 4 に示す。最終体重は2.5%群で有意な低値とな

った。実重量では0.625%群で心臓の有意な高値が、1.25%以上の群で肝臓および副腎の有意な低値が、2.5%群では脾臓の有意な低値が認められた。相対重量では0.625%で脳の有義な低値が、1.25%以上の群で肝臓および副腎の有義な低値が、2.5%群では腎臓、精巣および脳の有義な高値が認められた。

血清生化学検査の結果を Table 5 に示す。1.25%以上の群でAST、ALT、A/G比、T-Bil及びClは有意な高値が、T-Chol及びKの有義な低値が認められ、2.5%群ではTP及びGluの有義な低値が認められた。また、TG及びBUNは0.625%群において有意な低値を示したものの、用量相関性はみられなかった。

血液学的検査の結果を Table 6 に示す。0.625%以上の群でMCHの有義な高値と好塩基球の有義な低値が、1.25%以上の群でHGB及びMCVの有義な高値と白血球数、好酸球及び単球の低値又は有意な低値が認められた。2.5%群ではRBC及びReticulocyteの有義な低値がみられた。

D. 考察

D-1. 用量設定試験

Acetamideの一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験を実施するため、4週間の用量設定試験を行った結果、投与群では肝実重量及び相対重量が用量依存的に減少し、2.5%群から肝毒性パラメーターであるALT、AST及びALPの有義な上昇と、肝臓における病理組織学的変化が認められた。一方、5.0%群ではオーバルセルの過形成を除き、いずれの変化も減少又は消失した。これらは、一般状態の悪化に伴う摂餌量の減少によるものと考えられ、本用量は最大耐量を超えていると判断した。以上より、一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験における低用量、中間用量及び高用量をそれぞれ、0.625、1.25及び2.5%に設定した。

本試験では、肝重量の低値、AST及び

ALT の有意な上昇は 1.25% から認められ、これらは予備試験でも認められた肝毒性に伴う変化と考えられた。また、同群ではその他の血清生化学ならびに血液学的パラメーターの変化も認められており、これらの毒性学的意義については平成 31 年度に実施する病理組織学的解析の結果とともに考察する。また、*in vivo* における変異原性の有無を検討することで、acetamide の発がん性機序についても有用な知見が得られると考えられる。

E. 結論

一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験の用量設定試験から、acetamide が肝毒性を有することが明らかになった。その結果をもとに、本試験における投与量を 0.625、1.25 および 2.5% に設定し、本試験の動物実験を実施した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 発表論文

なし

G-2. 学会発表

- 1) 石井雄二，菊池玲美花，木島綾希，高須伸二，小川久美子，梅村隆志「F344 ラットを用いたアセタミドの 28 日間反復投与による肝毒性評価」第 35 回日本毒性病理学会学術集会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

- 1) Suzuki Y, Umemura T, Hibi D, Inoue T, Jin M, Ishii Y, Sakai H, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa K. Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats. Arch. Toxicol. 86, 1593-1601 (2012).
- 2) Suzuki Y, Umemura T, Ishii Y, Hibi D, Inoue T, Jin M, Ssakai H, Kodama Y, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa K. Possible involvement of sulfotransferase 1A1 in estragole-induced DNA modification and carcinogenesis in the livers of female mice. Mutat. Res. 749, 23-28 (2012).
- 3) Jin M, Kijima A, Suzuki Y, Hibi D, Inoue T, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K, Umemura T, Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with *gpt* delta rats. Toxicology, 290, 312-321.
- 4) Jin M, Kijima A, Hibi D, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kuroda K, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T, *In vivo* genotoxicity of methyleugenol in *gpt* delta transgenic rats following medium-term exposure. Toxicol. Sci. 131, 387-394.
- 5) JECFA : WHO Food Additives Series, Evaluation of Certain Food Additives, Report of 65th JECFA meeting , 2005
- 6) Diekmann J, Wittig A, Stabbert R, Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acrylamide and acetamide in cigarette mainstream smoke after on-column injection. J. Chromatogr. Sci., 46, 659-663 (2008).
- 7) Vismeh R, Haddad D, Moore J, Nielson C, Bals B, Campbell T, Julian A, Teymouri F, Jones AD, Bringi V, Exposure assessment of acetamide in milk, beef, and coffee using xanthidrol derivatization and gas chromatography/Mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 66, 298-305 (2018).

平成 30 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究課題：肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価

研究分担者： 高須 伸二 所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
石井 雄二 所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
西川 秋佳 所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
小川久美子 所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法（GPG 又は GNP モデル）は、*gpt delta* ラットを用いることにより、肝又は腎における発がん性・遺伝毒性を迅速に一つの試験で検出できる試験系である。本研究では、食品香料化学物質の安全性を *in silico*、*in vitro*、*in vivo* で階層的に評価する評価系を構築することを目的に、*in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物を対象として、GPG 又は GNP モデルによる *in vivo* での遺伝毒性・発がん性を検討する。本分担研究課題では、遺伝毒性が疑われる化合物としてリストアップされた候補化合物のうち、フラン環を基本骨格とする 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質とし、今年度は GPG 又は GNP モデルによる評価を実施するための用量設定試験を実施した。6 週齢の雄性 F344 ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 125, 250, 500 又は 1000 mg/kg/day の濃度で 1 日 1 回 7 日間強制経口投与した。その結果、1000 mg/kg/day 投与群の体重は投与期間中の何れの時点においても開始時より低値を示したことから、当該用量ではより長期の反復投与試験は実施できないと判断し、28 日間の反復投与試験は 500 mg/kg/day 程度を最高用量とした。続いて、6 週齢の雄性 F344 各に 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 60, 180 又は 540 mg/kg の濃度で 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。その結果、540 mg/kg/day 投与群では投与 1 週目から投与終了時まで有意な体重増加抑制がみられ、肝臓、腎臓、肺及び脾臓の相対重量は統計学的に有意な高値を示した。また、肝臓の相対重量は 180 mg/kg/day 投与群においても有意な高値を示した。今後、血清生化学的検査及び病理組織学的検査を実施し、本試験の実施用量を設定する予定である。

A. 研究目的

現在、食品香料として様々な化学物質が使用されているが、それらの生体影響については不明な点も多く、全ての香料の安全性が十分に担保されているとは言えない現状がある。本研究では香料化学物質の安全性を *in silico*、*in vitro*、*in vivo* で階層的に評価する評価系を構築し、食品香料の効率的且つ信頼性の高い安全性評価の推進に資する

ことを目的とする。このうち、本分担研究課題では *in silico*、*in vitro* 試験において遺伝毒性が疑われる香料について *in vivo* 試験系を用いて評価を行うことで、提唱する階層型試験系の開発に寄与することを目指す。

我々はこれまでに、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いて、個体レベルで遺伝毒性や発がん性を包括的に評価できるモデルを開発してきた。肝遺伝毒性・発がん性中期包括試験法（GPG モデル）又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試

験法 (GNP モデル) は, *gpt delta* ラットを用いて, 肝又は腎発がん性・遺伝毒性を一つの試験で迅速に検出することを可能にした試験系であり, これまでに本モデルを用いて香料などの化学物質の遺伝毒性・発がん性を検討してきた。

本研究では, 本間, 安井らの *in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物としてリストアップされた 10 候補化合物のうち, げっ歯類において肝発がん性を示すことが知られるフラン環を基本骨格とする香気成分である 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質として, GPG 又は GNP モデルによる *in vivo* での遺伝毒性・発がん性を明らかにすることを目的とする。今年度は, GPG 又は GNP モデルによる評価を実施するための用量設定試験を実施した。

B. 研究方法

B-1. 試薬及び動物

3-Acetyl-2,5-dimethylfuran は東京化成工業株式会社から購入した。コーン油は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。動物は 5 週齢の雄性 F344 ラットを日本エスエルシー株式会社から購入し, 一週間の馴化後, 実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24 ± 1 , 湿度 $55 \pm 5\%$, 換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ), 12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で, 飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収容し, 床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い, 週 2 回交換を行った。また, 試験期間中は飲料水として水道水を自由摂取させた。

B-2. 用量設定試験 (1) : 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の 7 日間反復投与 毒性試験

6 週齢の雄性 F344 ラット各群 3 匹にコーン油に混じた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を

125, 250, 500 又は 1000 mg/kg/day の濃度で 1 日 1 回 7 日間強制経口投与した。対照群にはコーン油を投与した。試験期間中は一般状態観察及び体重測定を 1 日 1 回実施した。投与終了後, イソフルラン麻酔下にて肝臓を摘出し, 重量測定を行った。

B-3. 用量設定試験 (2) : 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の 28 日間反復投与 毒性試験

6 週齢の雄性 F344 各群 5 匹にコーン油に混じた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 60, 180 又は 540 mg/kg の濃度で 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。投与終了後, 剖検日前日より一晩絶食させ, イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後, 血清生化学的検査を実施した。剖検時に肝臓, 腎臓, 脾臓, 肺, 消化管および鼻腔を摘出し, 肝臓, 腎臓, 脾臓及び肺に関しては, 重量の測定を行った。さらに, 摘出した臓器・組織については定法に従い病理組織学的検査を実施した。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して動物実験計画書を作成し, 同動物実験委員会による承認を得た後に実施した。

C. 研究結果

C-1. 用量設定試験 (1) : 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の 7 日間反復投与 毒性試験

投与期間中, 何れの群においても死亡動物は認められなかった。一般状態観察において, 投与 2 日後から 1000 mg/kg/day 投与群の全例において鼻出血並びに紅涙が認められ, 同様の症状は投与 3 日後の 500 mg/kg/day 投与群の全例においても観察された。一方, 125 及び 250 mg/kg/day 投与群並びに対照群では一般状態の変化も認められなかった。各群の体重推移を Figure 1 に示す。

3-Acetyl-2,5-dimethylfuran 投与群において、用量依存的な体重の低値が認められた。投与終了後の肝重量の結果を Figure 2 に示す。投与終了後の絶対肝重量は、用量依存的に低値を示す傾向が認められたものの、相対肝重量に顕著な変化は認められなかった。

C-2. 用量設定試験 (2) : 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の 28 日間反復投与毒性試験

投与期間中、何れの群においても死亡動物は認められなかった。一般状態観察において、投与 1 週目から 540 mg/kg/day 投与群の全例で鼻出血及び紅涙が認められたが、症状は投与 3 週目以降には観察されなかった。一方、60 及び 180 mg/kg/day 投与群並びに対照群の一般状態に変化は認められなかった。

各群の体重推移と摂餌量を Figure 3 及び 4 に示す。540 mg/kg/day 投与群において、投与 1 週目から投与終了時まで統計学的に有意な体重増加抑制が認められた。また、540 mg/kg/day 投与群の摂餌量は対照群に比して低い傾向が認められた。

投与終了後の臓器重量の結果を Table 1 に示す。臓器重量を測定した結果、540 mg/kg/day 投与群において肺及び脾臓の絶対重量の低値が認められた。また、180 mg/kg/day 以上の投与群の相対肝重量及び 540 mg/kg/day 投与群の肺、腎及び脾臓相対重量は有意な高値を示した。

D. 考察

in silico 解析結果から遺伝毒性が疑われた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran について、GPG 又は GNP モデルを用いて肝又は腎における遺伝毒性・発がん性を評価することを目的に、今年度は本試験を実施するための用量設定試験を実施した。

強制経口投与での標準的な投与量の上限である 1000 mg/kg/day を最高用量として、F344 ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 7

日間反復投与した結果、1000 mg/kg/day 投与群で投与 2 日目から鼻出血及び紅涙が認められ、体重は投与期間中の何れの時点においても投与開始時より低値を示した。一方、500 mg/kg/day 投与群では、1000 mg/kg/day 投与群と同様に鼻出血及び紅涙が観察され、投与翌日から体重減少が認められたものの、投与 4 日目からは体重は増加し、投与 7 日後では投与開始時と同程度であった。このことから、1000 mg/kg/day では長期間の投与を継続することが困難であると判断し、500 mg/kg/day 程度を最高用量として 28 日間の反復投与試験を実施した。

540 mg/kg/day を最高用量に、180 又は 60 mg/kg/day の用量で 28 日間反復投与した結果、540 mg/kg/day 投与群では投与 1 週目から投与終了時まで有意な体重増加抑制が認められた。540 mg/kg/day 投与群では肝臓、腎臓、肺及び脾臓の相対重量は高値を示した。また、肝臓の相対重量は 180 mg/kg/day 投与群においても有意な高値を示した。これらの相対重量の変化は、体重増加抑制に関連する可能性が考えられたが、肝臓、腎臓の絶対重量は 180 mg/kg/day 投与群でわずかながら増加傾向を示したことから、投与に起因した変化である可能性も否定できないと考えた。今後、血清生化学的検査及び病理組織学的検査を実施することで、3-acetyl-2,5-dimethylfuran の毒性影響と毒性標的臓器を明らかにし、本試験の実施用量を設定する予定である。

E. 結論

in silico 解析結果から遺伝毒性が疑われた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran について、GPG 又は GNP モデルを用いて肝又は腎における遺伝毒性・発がん性を評価することを目的に、今年度は本試験を実施するための用量設定試験を実施した。540 mg/kg/day を最高用量に 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 28 日間反復投与した結果、540 mg/kg/day 投与群では肝臓、腎臓、肺及び脾臓の相対重量は高

値を示した。また、肝臓の相対重量は 180 mg/kg/day 投与群においても有意な高値を示した。今後、血清生化学的検査及び病理組織学的検査を実施し、本試験の実施用量を設定する予定である。

F．健康危険情報

特になし

G．研究成果

G-1．発表論文

なし

G-2．学会発表

なし

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

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

分担研究課題名：オルガノイドの調製、オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備

研究分担者 今井俊夫 国立がん研究センター・研究所・動物実験部門長

研究要旨

本分担研究課題においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的として、バリデーション試験において使用する陽性および陰性対照物質の選択、ならびにオルガノイド樹立に使用するマウス系統差を明らかにするための解析を行っている。結果として、メタンスルホン酸エチル(EMS)処置したBALB/cおよびB6背景 *Trp53*ヘテロノックアウト (*p53* +/-) マウス由来肺オルガノイドでEMS濃度に対応し発がん性を示す上皮細胞の重層化 / 浸潤性 / 異型性がみられ、LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来肝臓(胆管)オルガノイドでもEMS高濃度群で同様の所見がみられた。ジエチルニトロサミンは肝臓(胆管)由来オルガノイドに対して明らかな変化を示さなかったが、アクリルアミド(AA)はBALB/c背景の野生型マウスにEMSと同様の変化を、7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン(DMBA)はBALB/c背景の *Trp53* +/- マウス由来乳腺オルガノイドに造腫瘍性を示した。安息香酸ナトリウム処置群では対照群との間に差はみられなかった。以上、EMSとAAについては平成27~29年度の厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)で明らかにした研究結果の再現性を確認し、DMBAについては新たに乳腺由来オルガノイドに発がん性を示すことを明らかにした。また、バリデーション試験において使用する陽性対照物質としてはAAを用いることとした。

A. 研究目的

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究において、レポーター遺伝子導入マウスから3次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質を検出し、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウスあるいはshRNAにより発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系を用いることで既知の発がん物質による造腫瘍性あるいは上皮細胞の重層化・浸潤性・異型性の誘発を指標とする発がん性物質を検出する方法を確立する。本分担研究においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的としている。平成30年度は、*gpt delta*マウス、BALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス、およびB6背景 LSL-*Kras*^{G12D}マウス(Cre導入あるいは陰性対照としてpLKO.1導入)の正常組織として肺と肝臓(胆管)からオルガノイドを調製して研究に供した。

本分担研究課題においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的としたバリデーション試験において使用する陽性および陰性対照

物質の選択、ならびにオルガノイド樹立に使用するマ

ウス系統差を明らかにするための解析を行った。具体的には、平成27~29年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)「腫瘍性病変をエンドポイントとするオルガノイド系を用いる食品添加物等の遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発」においてオルガノイドに対する*in vitro*処理により発がん性を示す形態学的変化を誘発することを明らかにしたメタンスルホン酸エチル(EMS)、アクリルアミド(AA)を陽性対照物質とし、更にジエチルニトロサミン(DEN)と7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン(DMBA)を加え、陰性対照物質としては安息香酸ナトリウム(SB)を用いた。また、マウス系統としてはBALB/cまたはC57BL/6J(B6)背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウスとB6背景LSL-*Kras*^{G12D}マウス(Cre導入あるいは陰性対照としてpLKO.1導入)の肺と肝臓由来オルガノイドを、更にBALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウスの乳腺由来のオルガノイドを調製し陽性物質に対する感受性を比較した。*In vitro*処置した各化学物質の発がん性評価は、オルガノイドをヌードマウス皮下に接種後~8週間経過後に採取した組

織の病理組織学的解析により行った。

B. 研究方法

(1) オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し造腫瘍性の観察あるいは病理組織学的解析により発がん性の有無を判定する際の形態学的特徴を明らかにするための検討

1) オルガノイドの調製

BALB/cまたはC57BL/6J (B6) 背景 *Trp53*ヘテロノックアウト (*p53* +/-) および野生型マウスとB6背景LSL-*Kras*^{G12D}マウス(Cre導入あるいは陰性対照としてpLKO.1導入)の肺および肝臓から、更にBALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウスの乳腺からオルガノイドを調製した。調製手順の概略は次の通りである。

[1日目]

-) 肺・肝臓・乳腺を摘出、細切、酵素処理
-) 12ウェルプレートに滴下、37℃で固まらせたマトリゲル上に単離細胞を播種し液体培地にて1日間培養

[2日目]

-) 液体培地を除きマトリゲルを重層
-) マトリゲル上に液体培地を加え培養

[1週間目(オルガノイドの増殖程度で判断)]

-) マトリゲルを除きオルガノイドを軽く破碎して継代
-) 1日目、2日目と同様の操作により培養継続
-) 継代・培養を3回程度繰返し

[オルガノイド樹立後の取扱い]

-) *p53* +/-マウス由来オルガノイド：*p53* +/-マウスおよび野生型マウス由来オルガノイドに対してレンチウイルス処置なし。
-) LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイド：Cre recombinase遺伝子を導入して*Kras*を活性化、あるいは陰性対照としてのpLKO.1を導入した。

2) オルガノイドへの化学物質暴露

-) 被験物質と適用オルガノイド：
メタンスルホン酸エチル(EMS)；B6およびBALB/c背景 *Trp53* +/- 野生型マウスあるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺および肝臓(胆管)オルガノイドに対して、0、0.05、0.2 mM (+S9 mix 50 µg/mL) 濃度にて暴露した。
ジエチルニトロサミン(DEN)；B6およびBALB/c背景 *p53* +/- 野生型マウスあるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドに対して、0、0.2、1.0 mM (+S9 mix) 濃度にて暴露した。
アクリルアミド(AA)；B6およびBALB/c背景

Trp53 +/- 野生型マウスあるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺オルガノイドに対して、0、0.28、1.4 mM (+S9 mix) 濃度にて暴露した。

7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン(DMBA)；BALB/c背景 *Trp53* +/- 野生型マウス由来の乳腺オルガノイドに対して、0、0.2、0.6 µM (+S9 mix) 濃度にて暴露した。

安息香酸ナトリウム；B6およびBALB/c背景 *Trp53* +/- 野生型マウスあるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺および肝臓(胆管)オルガノイドに対して、0、5、20 mM (+S9 mix) 濃度にて暴露した。

)処置：各オルガノイドに対する化学物質曝露は、3回にわたる継代時において、分散したオルガノイドを播種した2時間後に開始し、更に24時間後のマトリゲル重層時までに行った。また、化学物質を添加した培地には更にS9mixを加えた。

3) オルガノイドのヌードマウス皮下への接種

[オルガノイドの継代・培養を3回程度繰返し後]

-) オルガノイドをマトリゲルとともに回収し、等量のマトリゲルを混和した。
-) イソフルランによる麻酔下にて1ウェル分のオルガノイドを背部皮下1カ所に、1匹あたり左右2カ所に接種した。

(2) ヌードマウス皮下に接種したオルガノイドから形成された組織に対する病理組織学的評価および免疫組織化学による検討

1) パラフィン包埋切片の作製と病理組織学的評価

接種～8週後に熟練した技術者によりヌードマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、皮下から結節/腫瘤あるいはオルガノイド接種部位を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて1日固定した。常法に従い、パラフィン包埋した後、4 µmの切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいは必要に応じて粘液に染色性を示すアルシアンブルー-PAS染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

2) サイトケラチン(CK)19に対する免疫組織化学

パラフィン包埋切片に対し、脱パラフィン後にクエン酸緩衝液(pH6.0)にて10分間オートクレープ処置して抗原不活化を行った。一次抗体として抗CK19ウサギモノクローナル抗体(abcam社製)を用いてABC法により染色した。ペルオキシダーゼ反応によるジアミノベンチジンの発色により検出した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験の実施にあたり「動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、平成24年最終改正法律第50号)」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号、平成25年最終改正環境省告示第84

号)」及び「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日厚生労働省通知、平成27年2月20日一部改正）」を遵守した。また、「国立研究開発法人国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出し、理事長の実施承認を得た。実際の実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、屠殺は頸椎脱臼やイソフルラン麻酔下にて腹部大動・静脈からの脱血により行うなど動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号）等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認を得た後に実施した。

C. 研究結果

(1) メタンスルホン酸エチル (EMS)

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において、B6およびBALB/c背景 *Trp53*^{+/-}マウスおよび野生型マウス由来の肺オルガノイドについて、EMS処置群と非処置群ともに長径4~7 mm程度の白色~乳白色（一部赤褐色出血痕を含む）の結節としてみられ、EMS処置による明らかな違いは認められなかった（写真1-1）。また、pLKO.1（対照）あるいはCre処置後のLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺オルガノイドについても、EMS処置群と非処置群ともに長径3~8 mm程度の白色~乳白色の結節としてみられ、EMS処置による明らかな違いは認められなかった。

肝臓（胆管）オルガノイドについては、B6背景野生型マウスのEMS高濃度群、BALB/c背景 *Trp53*^{+/-}マウスのEMS低・高濃度群にて、EMS非処置対照群に比し淡桜桃色充実化あるいは大型化がみられた。LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の各群では乳白色~淡黄褐色の結節がみられたが、EMS処置による明らかな影響は認められなかった。

2) 病理組織学的所見

B6およびBALB/c背景 *Trp53*^{+/-}マウス由来肺オルガノイドでEMS濃度に対応し発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性がみられ（写真1-2）、B6背景野生型マウスではEMS高濃度群にて同様の所見がみられた一方、BALB/c背景野生型マウスではEMS濃度に対応した所見頻度の増加がみられたものの有意ではなかった。B6背景 *Trp53*^{+/-}マウスのEMS高濃度群の1/4例ではがん肉腫の形態を呈する造腫瘍性を示した。LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来肺オルガノイドにおいては、EMS処置の影響はみられなかった。

LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来肝臓（胆管）オルガノイドではEMS高濃度群で肺にみられたものと同様の所見がみられた。BALB/c背景 *p53*^{+/-}マウス由来肝臓（胆管）オルガノイドでも同様の所見がみられたが、EMS濃度への対応は明瞭ではなかった。B6背景 *Trp53*^{+/-}マウス及び野生型、BALB/c背景野生型由来肝臓（胆管）オルガノイドにEMS処置による明らかな影響は認められなかった。（表1）

(2) ジエチルニトロサミン (DEN)

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において、B6およびBALB/c背景 *p53*^{+/-}および野生型マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドについて、EMS処置群と非処置群ともに痕跡~長径7 mm程度の白色~乳白色（一部赤褐色出血痕を含む、B6背景 *p53*^{+/-}マウス由来オルガノイドは水胞形成傾向）の結節としてみられ、DEN処置による明らかな違いは認められなかった。

2) 病理組織学的所見

B6背景 *Trp53*^{+/-}と野生型マウス由来、ならびにLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来肝臓（胆管）オルガノイドでは、DEN処置により上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性を示す所見の頻度の増加傾向がみられたが有意ではなかった。BALB/c背景 *Trp53*^{+/-}と野生型マウス由来肝臓（胆管）オルガノイドでは、対照群とDEN処置群ともに1/4~3/4の頻度で上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性を示す所見がみられ、群間の明らかな違いはみられなかった。（表1）

(3) アクリルアミド (AA)

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において、BALB/c背景野生型マウスの肺オルガノイドについて、AA低濃度処置群にて1/4、高濃度処置群にて2/4の頻度で結節の黒色化がみられ、特に高濃度処置群の1/4は長径が20 mmと大型化を伴っていた（写真2-1）。BALB/c背景 *Trp53*^{+/-}マウス由来の肺オルガノイドは痕跡~長径7 mm程度の白色~乳白色（一部赤褐色出血痕を含む）の結節としてみられ、AA処置による明らかな違いは認められなかった。B6背景 *Trp53*^{+/-}マウスおよび野生型マウス由来の肺オルガノイドについてはAA非処置、AA処置群とも白色~乳白色（一部褐色化）の結節形成がみられたが、AA処置による明らかな変化はみられなかった。LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺オルガノイドは白色~乳白色を呈していたが、AA高濃度処置群にて2/4の頻度で褐色化がみられた。

2) 病理組織学的所見

BALB/c背景野生型マウス由来肺オルガノイドでAA濃度に対応し発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性がみられた（写真2-2）。BALB/c

背景 *Trp53*^{+/-}-マウス由来肺オルガノイドではAAの低濃度、高濃度群で各2/4の頻度で、B6背景 *Trp53*^{+/-}-マウスではAA低濃度群と高濃度群で各々1/4と2/4の頻度で、Cre処置後のLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来肺オルガノイドのAA高濃度群で2/4の頻度で同様の所見がみられたが有意ではなかった。(表1)

(4) 7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン (DMBA)

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において、BALB/c背景 *Trp53*^{+/-}-マウス由来の乳腺オルガノイドについて、DMBA高濃度処置群にて長径7~9 mm程度の乳白色の結節としてみられたが、DMBA低濃度処置群と非処置群との間に明らかな違いは認められなかった(写真3-1)。野生型マウスの乳腺オルガノイドについては、DMBA処置による明らかな違いは認められなかった。

2) 病理組織学的所見

BALB/c背景 *Trp53*^{+/-}-マウス由来の乳腺オルガノイドのDMBA高濃度処置群の4/4例では腺がん/扁平上皮がんの形態を呈する造腫瘍性を示し、DMBA低濃度処置群には一部に上皮細胞の重層化がみられたが限局的であった(写真3-2)。野生型マウスの乳腺オルガノイドについては、DMBA処置による明らかな変化はみられなかった。(表1)

(5) 安息香酸ナトリウム (SB)

1) 肉眼所見

B6およびBALB/c背景 *Trp53*^{+/-}-、野生型マウス、あるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺および肝臓(胆管)オルガノイドについて、ヌードマウス皮下にみられた痕跡を含む組織にSB処置の影響は認められなかった。

2) 病理組織学的所見

B6およびBALB/c背景 *Trp53*^{+/-}-、野生型マウス、あるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺および肝臓(胆管)オルガノイドについて、安息香酸ナトリウム処置による明らかな変化はみられなかった。但し、BALB/c背景野生型マウス由来の肺オルガノイドのSB非処置群にて3/4、BALB/c背景 *Trp53*^{+/-}-マウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドのSB非処置群にて4/4の頻度で上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性がみられたほか、SB非処置群で同所見が散見された。(表1)

以上、EMSについては B6およびBALB/c背景 *Trp53*^{+/-}-マウス由来肺オルガノイドでEMS濃度に対応し、AAについてはBALB/c背景野生型マウス由来肺オルガノイドでAA濃度に対応し発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性がみられるなど、平成27~29年度の厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)で明らかにした研究結果の再現

性を確認し、DMBAについては新たに乳腺由来オルガノイドに造腫瘍性を示すことを明らかにした。また、ジエチルニトロサミンは肝臓(胆管)由来オルガノイドに対して明らかな変化を示さず、陰性対照としてのSB処置群では対照群との間に差はみられなかった。以上の結果より、被験物質により、発がん性を示す病理組織学的変化にマウス系統差がみられることが明らかとなり、幅広い被験物質に感受性を示すマウス系統をみつけることが重要であると考えられた。来年度はrasH2マウスの正常組織由来のオルガノイドを中心に検討を進める。また、今年度の本研究課題オルガノイドパートでの複数施設間のバリデーション試験において使用する陽性対照物質としてはAAを用いることとした。

技術的な課題として、SBの評価を行ったBALB/c背景野生型マウス由来の肺オルガノイド、BALB/c背景 *Trp53*^{+/-}-マウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドなどでは化学物質非処置群において一定頻度で上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性がみられたことが挙げられる。その詳細な原因は不明であった。特にそれらが化学物質非処置群に3/4以上の高頻度でみられた際に使用したオルガノイドが、マウス組織から樹立後に一旦凍結保存、その後融解したものであったことから、オルガノイドの保存・継代条件に起因する変化である可能性などを考えた上で原因を明らかにし、今後は化学物質非処置群ではそのような所見がみられない条件を設定すべきである。

本分担研究課題における活動の一部として、2019年3月に米国、ボルチモアで開催された第58回米国毒性学会年次集会(Annual Meeting of the Society of Toxicology)で研究成果の一部をポスター発表した。同集会での基調講演で毒性試験におけるオルガノイド(細胞三次元培養法)について述べられていたほか、ポスター発表における質疑においても各施設でのオルガノイド培養技術の毒性学への応用に関して情報交換をすることができた。本研究課題における多施設での技術共有に関しては、日本国内における毒性学分野での細胞三次元培養法の発展に寄与するものと考えている。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Maru, Y., Onuma, K., Ochiai, M., Imai, T., Hippo, Y.: Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoids. *Cancer Sci.* 110, 858-866 (2019)
- (2) Ochiai, M., Yoshihara, Y., Maru, Y., Tetsuya, M., Izumiya, M., Imai, T., Hippo, Y.: *Kras*-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgz024 (2019)
- (3) Hori, M., Mutoh, M., Ishigamori, R., Imai, T., Takahashi, M.: Activated ductal

proliferation induced by
N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in
fat-infiltrated pancreas of KK-*A^y* mice. In
vivo 32, 499-505 (2018)

- (4) Hattori, N., Niwa, T., Ishida, T., Kobayashi, K., Imai, T., Mori, A. Kimura, K., Mori, T., Asami, Y., Ushijima, T.: Antibiotics suppress colon tumorigenesis through inhibition of aberrant DNA methylation in an AOM/DSS colitis model. Cancer Sci. 110, 147-156 (2019)
- (5) Machida, Y., Sudo, Y., Uchiya, N., Imai, T.: Increased susceptibility to mammary carcinogenesis and an opposite trend in endometrium in *Trp53* heterozygous knockout female mice by back-crossing the BALB/c strain onto the background C3H strain. J. Toxicol. Pathol. (In press, 2019)

2. 学会発表

- (1) 今井俊夫、成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆：
マウス大腸オルガノイドにおける PhIP 誘発がん
早期過程における遺伝子変異．第 65 回日本実
験動物学会総会（2018 年 5 月、富山）
- (2) 今井俊夫、成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆：
マウス正常上皮組織由来オルガノイドの化学発がん
物質に対する反応性．第 25 回日本がん予防学
会総会（2018 年 6 月、高松）
- (3) 成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆、今井俊夫：
マウス正常上皮オルガノイドを用いた化学発がん
過程の初期変化．第 45 回日本毒性学会学術年会
（2018 年 7 月、大阪）
- (4) 今井俊夫：新規 *in vivo*, *in vitro* モデルの発展
とその応用 - マウス正常組織由来オルガノイドの
化学発がん研究への応用．第 35 回日本毒性病理
学会学術集会シンポジウム 2(2019 年 2 月、東京)
- (5) Imai, T., Ochiai, M., Naruse, M., Hippo, Y.:
Carcinogenic alteration of mouse tissue-derived
organoids by chemical treatment. 58th Annual
Meeting of the Society of Toxicology (2019年3月、
ボルチモア、米国)

E . 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

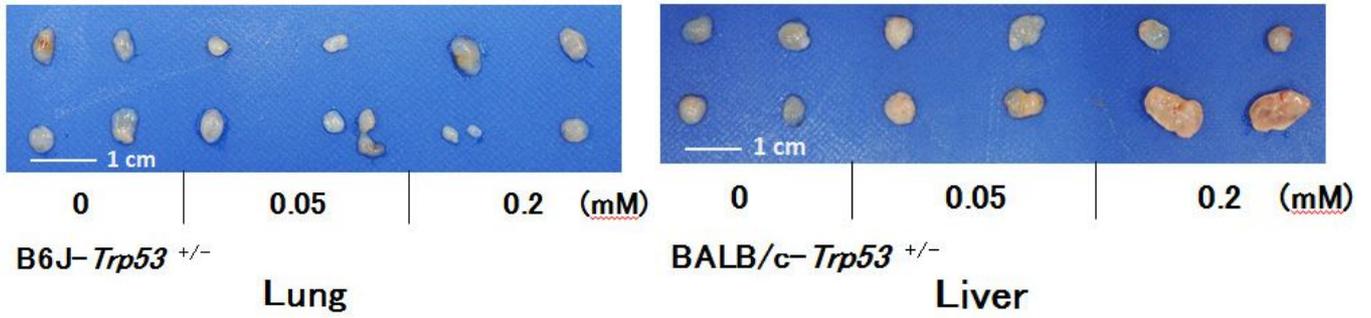
該当なし。

3. その他

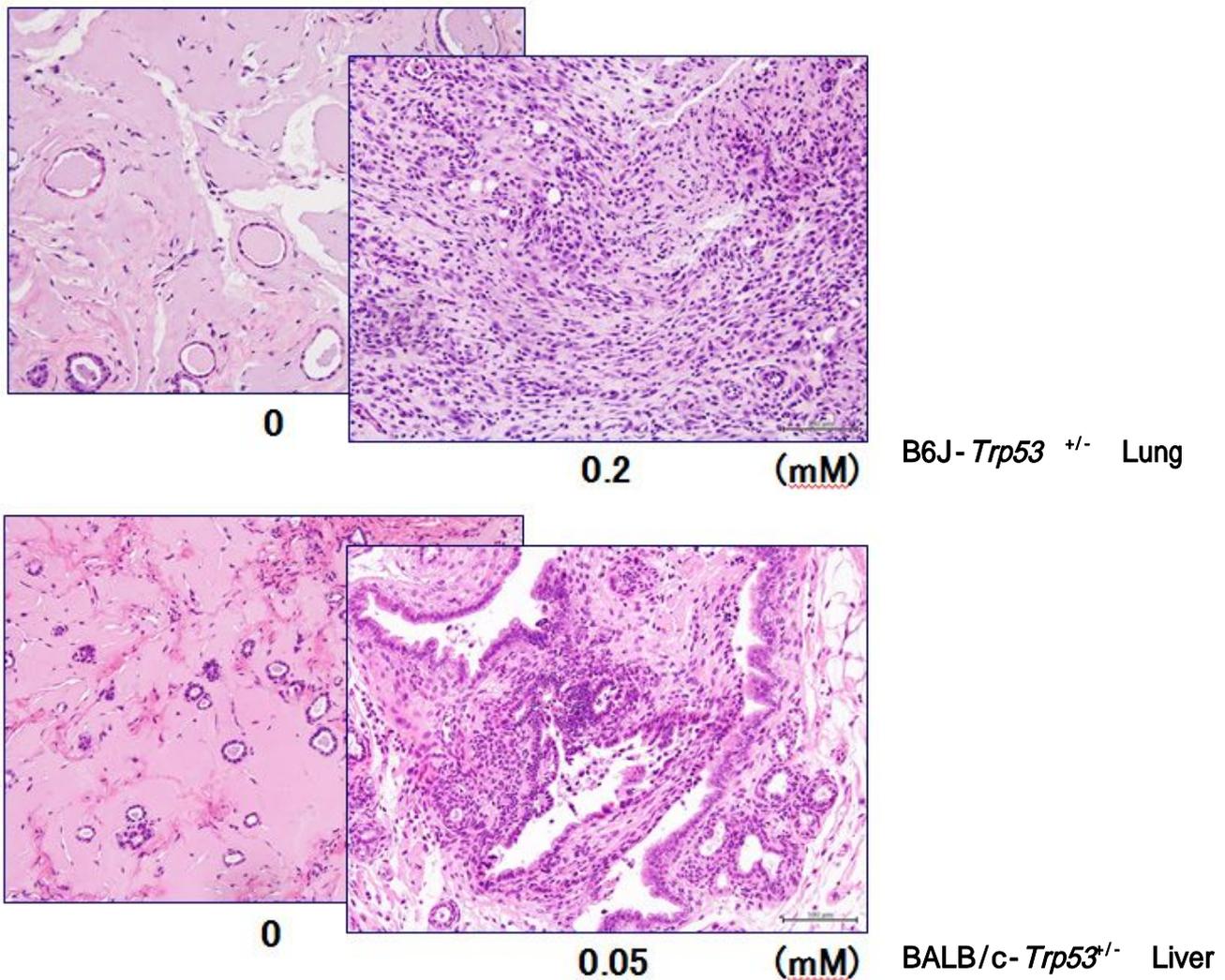
該当なし。

(表1)

マウス肺/肝由来オルガノイドに対する化学物質処置によるヌードマウス皮下での病理組織学的変化(上皮浸潤性/重層化)																		
マウス系統	遺伝子型	臓器	被験物質															
			メタンサルホン酸エチル			ジエチルニトロサミン			アクリルアミド			安息香酸ナトリウム(陰性対照)						
			対照	低濃度	高濃度	対照	低濃度	高濃度	対照	低濃度	高濃度	対照	低濃度	高濃度				
B6	野生型	肺	0/4	0/4	3/4	X	X	X	0/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4				
	<i>p53</i> ^{+/-}		0/4	1/4	4/4*				0/4	1/4	2/4	2/4	2/4	1/4				
BALB/c	野生型		1/4	3/4	4/4				0/4	1/4	2/4	0/4	1/4	4/4	3/4	1/4	3/4	
	<i>p53</i> ^{+/-}		0/4	1/4	4/4				0/4	2/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		
B6- <i>Kras</i> ^{G12D} -LSL	pLKO		0/4	0/4	0/4				0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	0/4		
	Cre		0/4	0/4	0/4				0/4	0/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		
B6	野生型		肝	0/4	1/4				1/4	0/4	1/4	2/4	X	X	X	0/4	0/4	0/4
	<i>p53</i> ^{+/-}			1/4	0/4				2/4	0/4	2/4	3/4				1/4	1/4	0/4
BALB/c	野生型	0/4		0/4	0/4	1/4	2/4	3/4	1/4	0/4	0/4							
	<i>p53</i> ^{+/-}	0/4		2/4*	2/4	2/4	2/4	2/4	4/4	2/4	3/4							
B6- <i>Kras</i> ^{G12D} -LSL	pLKO	0/4		0/4	3/4	0/4	2/4	1/4	0/4	0/4	0/4							
	Cre	0/4		0/4	4/4	0/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4							
					* 1/4造腫瘍性を含む													
																	: p=0.012	
													: p=0.018 (mxn分割表)					



(写真1 - 1) EMS処置したB6背景*Trp53*^{+/-}マウス由来の肺オルガノイド(左)とBALB/c背景*Trp53*^{+/-}マウス由来の肝臓(胆管)オルガノイド(右)のヌードマウス皮下接種後の肉眼像。B6背景*Trp53*^{+/-}マウス由来の肺オルガノイドではEMS処置による明らかな違いはみられないが、BALB/c背景*Trp53*^{+/-}マウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドでは、EMS処置により淡桜桃色充実化あるいは大型化がみられる。



(写真1 - 2) EMS処置したB6背景*Trp53*^{+/-}マウス由来の肺オルガノイド(上)とBALB/c背景*Trp53*^{+/-}マウス由来の肝臓(胆管)オルガノイド(下)のヌードマウス皮下接種後の病理組織像。。B6背景*Trp53*^{+/-}マウス由来の肺オルガノイドではEMS0.2 mM処置によりがん肉腫様を呈し、BALB/c背景*Trp53*^{+/-}マウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドでは、EMS0.05 mM処置により上皮細胞の重層化、浸潤性がみられた。

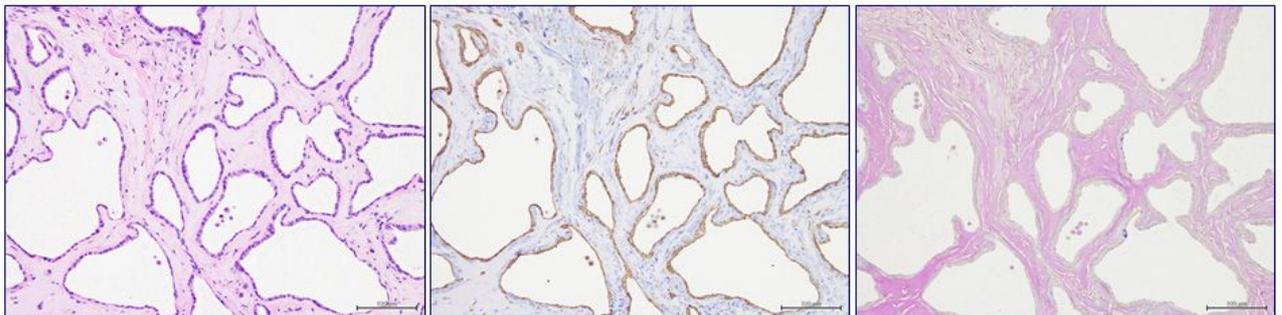


BALB/c-wt
0

0.28

1.4 (mM)

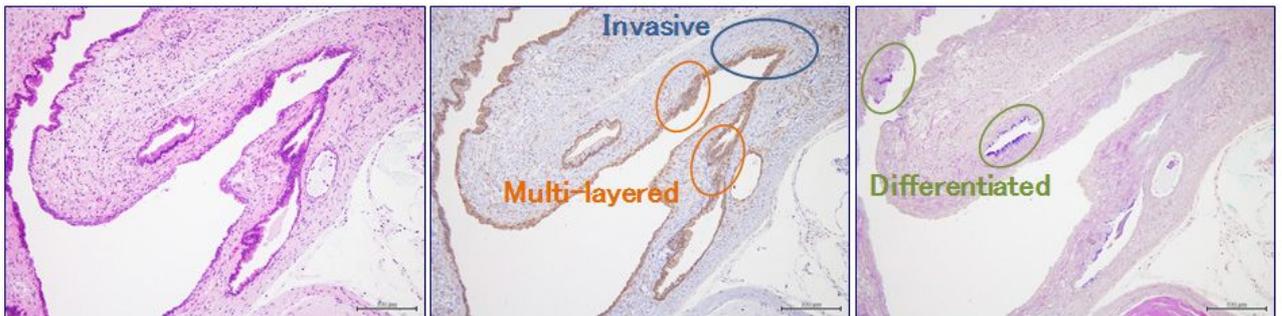
(写真2 - 1) AA処置したBALB/c背景野生型マウス由来の肺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の肉眼像。0.28および1.4 mM処置群では、各1/4および2/4の頻度で結節の黒色化がみられる。



BALB/c-*Trp53*^{+/-} AA-0 mM

CK19 (for lung epithelia)

Alucian blue-PAS (for mucin)



BALB/c-*Trp53*^{+/-} AA-1.4 mM

CK19

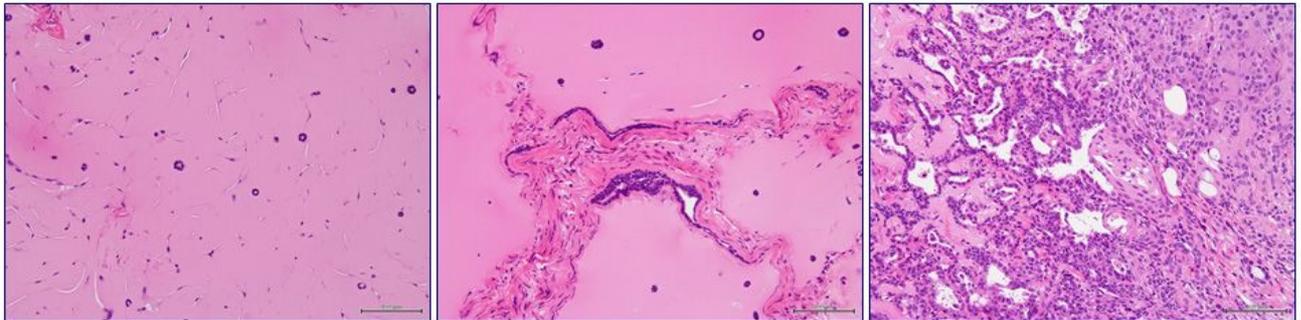
Alucian blue-PAS

(写真2 - 2) AA処置したBALB/c背景*Trp53*^{+/-}マウス由来の乳腺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。1.4 mM処置群では非処置(0 mM)群に比し、上皮細胞の重層化、浸潤性がみられた。また、1.4 mM処置群では粘液をもつ分化した細胞も混在していた。



BALB/c-*Trp53*^{+/-} 0 0.2 0.6 (μM)

(写真3-1) DMBA処置したBALB/c背景*Trp53*^{+/-}マウス由来の乳腺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の肉眼像。0.6 μM処置群では、乳白色の明らかな結節形成がみられる。



0 0.2 0.6 (μM)

(写真3-2) DMBA処置したBALB/c背景*Trp53*^{+/-}マウス由来の乳腺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。0.2 μM処置群では非処置(0 μM)群に比し、一部上皮細胞の重層化がみられるが限定的であった。一方、0.6 μM群では腺がん(写真左方)あるいは扁平上皮がん(写真右方)の形態を呈する造腫瘍性がみられた。

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

分担研究課題名：オルガノイドの調製

研究分担者 落合 雅子
国立研究開発法人国立がん研究センター研究所 外来研究員

研究要旨

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究において、レポーター遺伝子導入マウスから3次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質を検出し、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウスあるいはshRNAにより発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系を用いることで腫瘍様組織あるいは増殖活性・異型性・浸潤性を指標として既知の発がん性物質を検出する方法を確立する。本分担研究においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的としている。平成30年度は、*gpt delta*マウス、BALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス、およびB6背景LSL-*Kras*^{G12D}マウス（Cre導入あるいは陰性対照としてpLKO.1導入）の肺と肝臓由来オルガノイドを調製し、他の分担研究者へ送付した。なお、今回は常温での輸送方法を探ったが、到着後速やかに培地を再添加して37℃、5%CO₂下に継続して培養できることが確認された。

A．研究目的

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究において、レポーター遺伝子導入マウスから3次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質の検出し、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウスあるいはshRNAにより発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系を用いることで既知の発がん物質が腫瘍様組織あるいは増殖活性・異型性・浸潤性を指標とする発がん性物質を検出する方法を確立する。本分担研究においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的としている。平成30年度は、*gpt delta*マウス、BALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス、およびB6背景LSL-*Kras*^{G12D}マウス（Cre導入あるいは陰性対照としてpLKO.1導入）の正常組織として肺と肝臓（胆管）由来オルガノイドの調製を担当した。

B．研究方法

C57BL/6JJmsSlc-Tg (*gpt delta*) マウス（雄、4週齢）2匹を日本SLC社より購入し、1週間の順化期間後に安楽死させた後に肺と肝臓を摘出、以下の手順

に従ってオルガノイドを調製した。BALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス、およびB6背景LSL-*Kras*^{G12D}マウスについては自家繁殖した雄各2匹を5週齢時に使用した。

肺の肺門部、肝臓の肝門部を除いて細切し、PBS(-)中で強く撹拌した後に遠心した。DispaseII (Roche)、Collagenase P (Roche)を含む酵素液で37℃、30分間処置した後、ピペティングにて細胞を分散させ、Cell strainerを通して、12ウェルプレートを用いてMatrigel (Corning)上に播種し、BSAのほか、EGF (Peprotech)、Noggin (Peprotech)、Y27632 (和光純薬)、Jagged-1 (AnaSpec)など増殖因子を含む培地で37℃、5%CO₂下に1日間培養、Matrigelを重層化して更に培養した。1週間に1回程度継代しつつオルガノイドを増やした。継代方法については「マウス正常組織由来オルガノイドの培養手順書」として纏め（図1）、増やしたオルガノイドについては、12ウェルプレートとして常温にて宅配便で他の分担研究者へ送付した。

なお、B6-LSL-*Kras*^{G12D}マウスの肺および肝臓由来オルガノイドについては、Creリコンビナーゼ遺伝子配列が挿入されたLV-Cre pLKO.1 (Addgene plasmid 25997)と陰性対照としてLV-pLKO.1で処置した後、ピューロマイシン添加培地で選択増殖させたオルガ

ノイドを調製した。

C. 研究結果と考察

*gpt delta*マウス、BALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス、およびB6背景 *LSL-Kras^{G12D}*マウスの肺及び肝臓（胆管）由来オルガノイドは、何れも3~5回程度継代すると12ウェル程度に増やすことができたが（図2）、他の分担研究者へ送付する目的、および今年度の施設間バリデーションを取る目的で使用する化学物質を選択するための実験に用いる目的で、更に継代を続けてオルガノイドを増やした。なお、今年度は他施設にオルガノイドを輸送する方法として、マトリゲル上加えた培地を除き12ウェルプレートとして常温にて送付したが、到着後速やかに培地を再添加して37℃、5%CO₂下にて継続して培養できることが確認された。

（倫理面への配慮）

動物実験の実施に際しては、各研究施設の動物実験倫理委員会の承認を得た後に行い、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。遺伝子組換え生物等を用いる実験については、実施機関の承認を得た。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Maru, Y., Onuma, K., Ochiai, M., Imai, T., Hippo, Y.: Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoids. *Cancer Sci.* 110, 858-866 (2019)
- (2) Ochiai, M., Yoshihara, Y., Maru, Y., Tetsuya, M., Izumiya, M., Imai, T., Hippo, Y.: *Kras*-driven heterotopic tumor development

from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgz024 (2019)

2. 学会発表

- (1) 今井俊夫、成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆：マウス大腸オルガノイドにおける PhIP 誘発がん早期過程における遺伝子変異．第 65 回日本実験動物学会総会（2018 年 5 月、富山）
- (2) 今井俊夫、成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆：マウス正常上皮組織由来オルガノイドの化学発がん物質に対する反応性．第 25 回日本がん予防学会総会（2018 年 6 月、高松）
- (3) 成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆、今井俊夫：マウス正常上皮オルガノイドを用いた化学発がん過程の初期変化．第 45 回日本毒性学会学術年会（2018 年 7 月、大阪）
- (4) Imai T, Ochiai M, Naruse M, Hippo Y: Carcinogenic alteration of mouse tissue-derived organoids by chemical treatment. 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2019年3月、ポルチモア、米国)

E. 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

マウス正常組織由来オルガノイドの培養手順

2018年10月29日 ver. 2.0

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の
開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究
(H30-食品一般-003)

II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究グループ

1. 送付するオルガノイドの概要

(1) BALB/c-WT と $p53^{+/-}$ マウス肺由来オルガノイド

- ・2018年6月11日 (♂、5週齢、1匹)から肺を摘出
- ・2018年8月10日 (passage 10)にて凍結(-80°C)

(2) *gpt delta*マウス肺由来オルガノイド

- ・2018年8月7日 (♂、5週齢、1匹)から肺を摘出
- ・2018年8月31日 (passage 4)にて凍結(-80°C)

2. 送付

(1) 常温輸送

・発送

12 wellプレートで培養したオルガノイド
→培地を回収、パラフィルムでシールしたプレートにキムタール
と梱包材で包んで発砲スチロール箱にいれ、常温送付(天地
無用扱い)

・受取

12 wellプレートに肺用(d1)培地 0.8~1 mL/well添加(フィル
ターチップを使用のこと)
→37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養

3. 解凍/培養

(2) 培養

・肺用d0培地とd1培地

肺オルガノイド用培地組成			
	単位	0d	1d
AD/F12+E	mL	1	1
Y	μL	0.2	-
A	μL	0.05	0.05
FGF10	μL	0.4	0.4
BSA7.5%液	μL	130	26

AD/F12+E: AD/F12(L-Glu+PSF) 40mLにEを20μL添加
AD/F12(L-Glu+PSF): L-Glu 1X, P-S 1X, F 2 μL/mL
E: 100 ng/μL - 0.1%BSA (740μL D-PBS + 10μL 7.5% BSA)にて希釈
Y: 5mM Y27632
A: 2.5mM A-83-01
FGF10: 100 μg/mL FGF10, Mouse

※各growth factorは0.1%BSA(7.5%BSA 10μL + D-PBS 740μL)で希釈、1.5mLチューブに
分注、凍結保存

4. 継代

(1) 継代(前半)

- ア) 培地を回収(省略可)
- イ) スクレイバーにてマトリゲルを回収(0.5 mL/wellのPBS(-)で2回洗う)
- ウ) 400g 3分遠心、上清を除き、1 mLのPBS(-)添加後必要に応じてボルト
テックス
- エ) 遠心、上清除き、Accumaxを0.8 mL/well添加し必要に応じてボルト
テックス、常温12分(または恒温槽37°C、5分)

(2) プレートの準備

12 wellプレートに 65 μL/wellのマトリゲルを添加
(AD/F12 + E培地などにてプレートを濡らしておく、p.6参照)
37°Cにて25分間固める

(3) 継代(後半)

- オ) PBS(-) 1 mLを加え遠心、更に1回洗浄
- カ) 肺用d0培地 0.65mL/wellにて懸濁後マトリゲル上に播種
- キ) 翌日に培地を回収し、70~80 μL/wellのマトリゲルを被せて37°Cで
25分間固めた後、肺用d1培地0.8~1 mL/wellを重ね

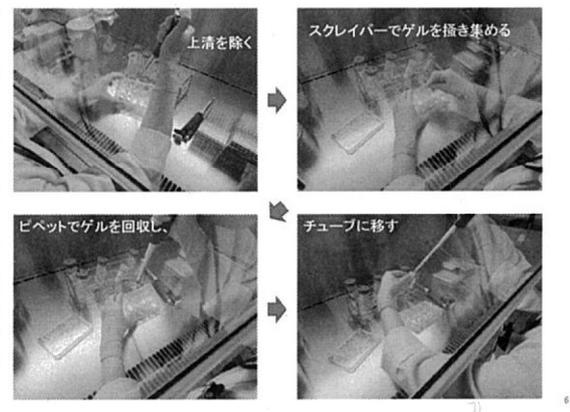
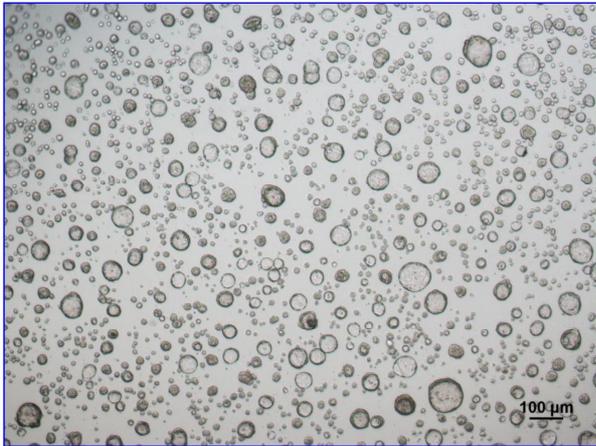
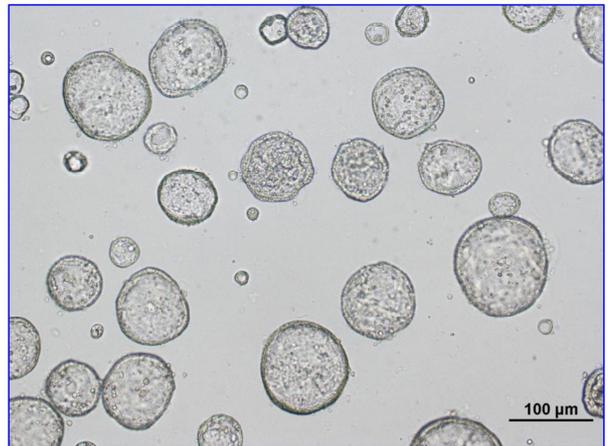
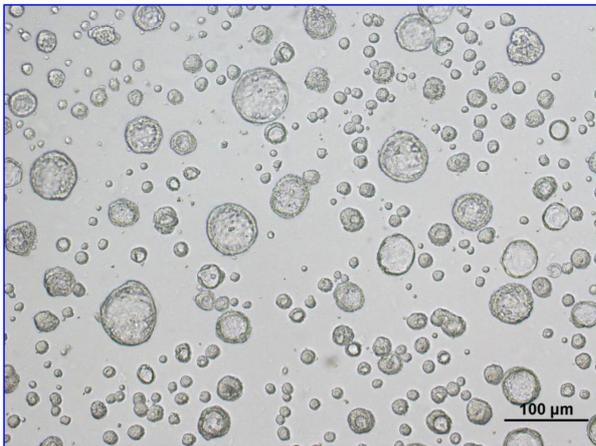
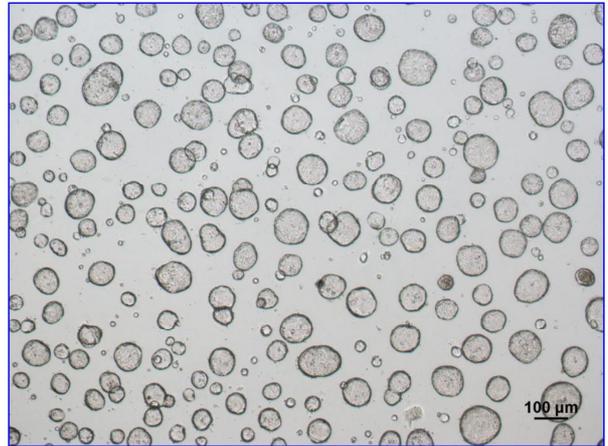


図1 マウス正常組織由来オルガノイドの培養手順書書(抜粋)

肺



肝臓(胆管)



1

図2 *gpt delta*マウスオルガノイド(4継代目)

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

分担研究課題名：オルガノイド遺伝毒性解析実験に関する研究

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

短・中期の発がん性が予測可能な簡便な*in vitro*試験法の確立を目的として、トランスジェニックマウスである*gpt delta*マウスより各種臓器のオルガノイドを作成し、食品添加物の遺伝毒性評価に応用可能かどうかについて検討を行っている。今年度は、発がんの非標的臓器である肝臓を用いて、PhIPの遺伝毒性を解析した。5週齢の*gpt delta*マウスから肝臓を切り出し細切、コラゲナーゼ/ディスパーゼ処理により細胞を単離後、マトリゲル中で三次元培養、継代を行ないオルガノイドの作成を行った。作成した肝臓のオルガノイドに、既知の遺伝毒性発がん物質であるPhIPを0, 5, 10 μ Mの濃度でS9mixの存在下のもと曝露した。オルガノイドより常法に則ってゲノムDNAを抽出し、インビトロパッケージング法により標的遺伝子をプラスミドとして回収し、*gpt*変異解析用の試験菌株に感染させて変異頻度の解析を行った。その結果、PhIP曝露によって変異頻度が上昇したが、濃度依存的な上昇は観察されなかった。PhIPの発がん標的臓器である大腸に比べると、変異頻度の上昇率が大きく、*in vivo*試験とは異なる様相を呈した。オルガノイドにすることで細胞増殖頻度が増加し、変異が蓄積しやすくなったと考えており、現在、肝臓、大腸オルガノイドについて、細胞増殖やPhIP-DNA付加体の解析を行う準備を進めている。また、同様に作成した肺オルガノイドを用いて、加熱食品中に含まれるアクリルアミド(AA)を0, 0.28, 1.4 μ Mの濃度でS9 mix存在下で曝露した結果、高用量曝露によってオルガノイドの形態変化が観察された。

A．研究目的

既存の食品添加物に対する*in vivo*遺伝毒性試験としては、小核試験（染色体異常試験）やレポーター遺伝子を標的とした遺伝子突然変異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、これらの試験のみでは食品添加物の発がん性の予測は難しい。通常、発がん性試験は大量の実験動物を用い、かつ長期間を要することから、短・中期の発がん性が予測可能な簡便な*in vitro*試験法が必要であると考えられる。本研究は、実験動物より作成した各臓器のオルガノイドを食品添加物の遺伝毒性及び発がん性の予測に用いることの妥当性について検討することを目的としている。昨年度までに遺伝毒性試験に汎用されているトランスジェニックマウスである*gpt delta*マウスより大腸、肝臓を摘出し、オルガノイドの安定した作成手法を確立し、それらオルガノイドを食品添加物の遺伝毒性試験に利用することの妥当性について検討してきた。今年度は、食品由来の既知遺伝毒性発がん物質であるPhIPの遺伝毒性を、発がん非標的臓器である肝臓オルガノイドを用いて解析し、*in vivo*遺伝毒性試験結果との比較を行うことでその妥当性について評価した。さらに、オルガノイドを用いた遺伝毒性試験法が、他施設間で一致した結果が得られるか検証するために、同一個体の肺から作成したオルガノイドを静岡県立大学へ分与し、同じプロトコルでAAを曝露させた。

B．研究方法

オルガノイドの作成と被験物質の曝露

5週齢の雄性マウスから肝臓を切り出しそれぞれ細切、コラゲナーゼ/ディスパーゼ処理により細胞を単離後、マトリゲル中で三次元培養しオルガノイドを得た。肝臓より作成したオルガノイドに食品由来の既知遺伝毒性

発がん性物質として知られている PhIP を代謝活性化酵素(S9 mix)の存在下で 0, 5, 10 μ M の濃度で曝露し、点突然変異頻度及び変異スペクトルの解析を行った。

gpt 遺伝子を指標とした変異原性試験

コントロールおよびPhIPを曝露したからオルガノイドからDNAを抽出し、*in vitro*パッケージングによってトランスジーン EG10をファージ粒子として回収した。回収したファージをCre組替え酵素発現している大腸菌YG6020株に感染させると、EG10上にある一組のloxP配列に挟まれた領域がCre組替え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後のYG6020菌液を6-thioguanin (6-TG) とchloramphenicol (Cm) を含むM9寒天培地に播いて37℃で培養すると、プラスミド上の*gpt*遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TGを含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cmを含むM9寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出した。更に、変異スペクトラムを解析するために、変異体の*gpt*遺伝子をダイレクトシーケンス法により解析した。

肺オルガノイドへのAA曝露

5週齢の雄性マウスから肺を切り出し細切、コラゲナーゼ/ディスパーゼ処理により細胞を単離後、マトリゲル中で三次元培養しオルガノイドを得た。継代のタイミングでセルカウントし、12wellプレートへ 1.0×10^5 /wellに調製して播種した。そこへ、S9mixとAAを混合したものを加え、24時間曝露させた。曝露後、PBS(-)で1回洗浄し、マトリゲルを重層して液体培地を加え、約1週間培養した。これを合計3回繰り返し、*gpt*変異解析用に2回、6wellになるまで継代した。増殖させたオルガノイドからマトリゲルを除いて回収し、DNA抽

出まで-80 で保存した。

C. 研究結果

常法に則って肝臓由来オルガノイドからゲノムDNAを抽出し、インビトロパッケージング法により標的遺伝子をプラスミドとして回収し、*gpt*変異解析用の試験菌株に感染させて変異頻度の解析を行った。その結果、PhIP曝露によって変異頻度は0 μM (n=4)で $1.1 \pm 1.4 \times 10^{-5}$ 、5 μM (n=3)で $8.9 \pm 12 \times 10^{-5}$ 、10 μM (n=4)で $7.7 \pm 7.6 \times 10^{-5}$ であった。データのバラツキが大きく、統計学的有意差はつかないものの、5、10μMでは約8倍程度に上昇する傾向が観察された(図1)。増村らによる*in vivo*試験の結果では、PhIPは発がん非標的臓器である肝臓でも変異頻度の上昇を認めている(Masumura K et al, 2000, Carcinogenesis)。しかしながら、今回の肝臓オルガノイドを用いた系では、先行研究で得られた発がん標的臓器である大腸よりも変異頻度が上昇していた。大腸由来オルガノイドでの突然変異頻度を図2に示す。生体内では、肝臓よりも大腸の方が細胞増殖の頻度が高いが、オルガノイドにすることで増殖頻度が増加し、変異が蓄積しやすくなったことが変異頻度の上昇につながったのではないかと考えており、現在、肝臓、大腸オルガノイドについて、細胞増殖のマーカーであるKi-67を調べることで説明できると考え、準備を進めている。また同時に、PhIP-DNA付加体の解析も行う予定である。

肺オルガノイドのAA曝露

継代毎に細胞数を揃えた肺オルガノイドへAAを曝露した結果、1.4μMで形態変化が表れた。露直後ではいずれも形態変化を起こさなかったが、曝露後1週間の培養中に、0μM、0.28μMではオルガノイドのバルーン形状を保ったままであったが、1.4μMではバルーン形状が崩れ、辺縁が波立った形態へと変化した。(図3)しかし、変異原性試験用に2回の継代をすると、1.4Mで見られた形態変化したオルガノイドの数が減少した。AA曝露後に増殖させ、凍結保存したオルガノイドについては来年度以降、DNA抽出、変異原性試験および変異スペクトラム解析を行う。静岡県立大学での結果とあわせて、新規遺伝毒性評価法として有用か評価する。

(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。

図1 肝臓由来オルガノイドを用いたPhIPの遺伝子変異原性試験

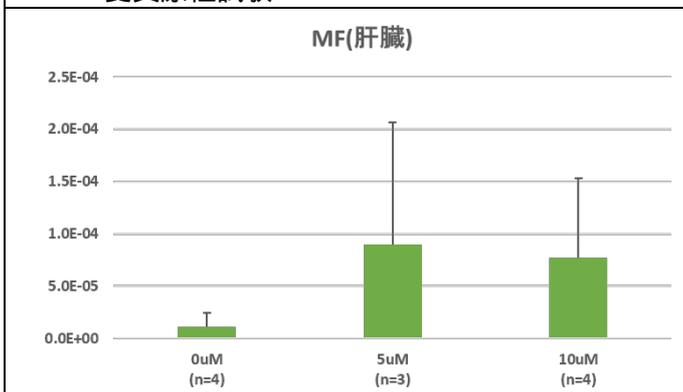


図2 大腸由来オルガノイドを用いたPhIP遺伝子変異原性試験 (参考資料)

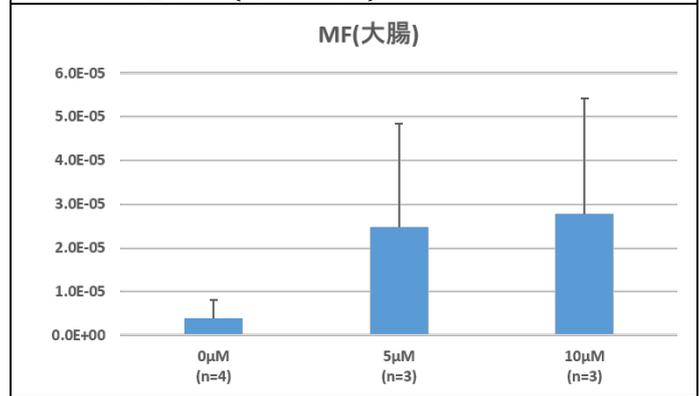
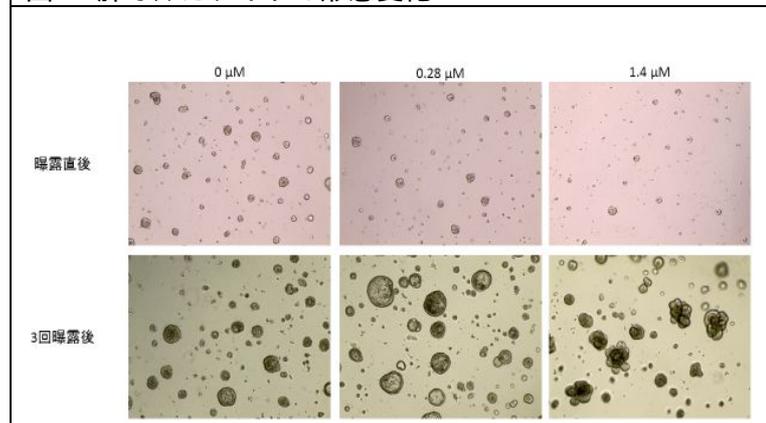


図3 肺オルガノイドの形態変化



D. 研究発表

1. 論文発表

- Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL. High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Res.* in press, 2019.
- 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.
- 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. *Journal of Applied Toxicology*, 2018, 38:537-543.

2. 学会発表

- 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)
2. 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)
 3. 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二: 芳香族アミン類の代謝物分析とDNA付加体 第33回発がん病理研究会 (御殿場、2018年8月)
 4. 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)
 5. 斎藤春五、高橋沙奈衣、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊: ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第77回日本癌学会総会 (大阪、2018年9月)
 6. 高橋沙奈衣、斎藤春五、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊: 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)
 7. 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)
 8. 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)
 9. 前迫有也、椎崎一宏、高村岳樹、戸塚ゆ加里: 職業性胆管がん発生に関与する 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)
 10. 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)
 11. 斎藤春吾、渡邊昌俊、戸塚ゆ加里: ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第47回日本環境変異原

学会 (京都、2018年11月)

12. 石野孔祐、前迫有也、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)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

E. 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

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

分担研究課題名：オルガノイド皮下移植系の病理学的評価

研究分担者 三好規之 静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究要旨

本分担班では、腫瘍性病変をエンドポイントとする発がん性試験法に関連し、オルガノイドをヌードマウス皮下に移植した際の造腫瘍性とともに、病理組織学的に発がん性の有無を判定する際の形態学的特徴を明らかにするための解析を進めている。一方、本分担課題における本年度の検討では、オルガノイドを用いた試験結果における施設間でのばらつきについて基礎的なデータを蓄積する目的で、国立がん研究センターにて調製されたgpt deltaマウス肺オルガノイドを静岡県立大学へ輸送し、継代培養後に披験物質（アクリルアミド）を曝露することで、次年度実施予定の遺伝毒性試験の試料調製を行った。

A．研究目的

食品添加物等の生体における遺伝毒性評価法として、レポーター遺伝子をマウス・ラットに導入した遺伝子突然変異検出系の開発により評価精度が向上したが、発がん性については長期試験の時間・使用動物削減・経費面の課題と短・中期試験からの予測による不確実性を克服する評価法の開発を要する。我々はマウスの大腸・肺等の正常組織から3次元培養法によりオルガノイドを調製し、臓器毎の発がん機序に基づく遺伝子改変操作を加えてヌードマウスに皮下移植すると腫瘍様組織を形成し、既知の発がん物質処置により当該組織の増殖活性・異型性・浸潤性を指標とする悪性化が誘導できることを見出した。本研究班では、遺伝毒性・発がん性短期包括的試験法の開発を目指しているが、最終的にその妥当性が検証されるとともに、多施設で実施可能な方法として確立できることが重要である。現在マウス正常組織から3次元培養法によりオルガノイドを調製する技術は幅広く行われてはならず、必要な試薬類にも高価なものが含まれる。しかし、経費面では長期発がん性試験に対比し十分な費用対効果が見込まれ、普及面では哺乳類培養細胞を用いる小核試験等のように、実施機関や技術者の基盤整備・技術訓練により普及した系も存在することから、本研究での成果は広く食品添加物等の安全性評価に活用可能と考えられる。一方、オルガノイドの調製条件の違いにより施設間で得られる試験結果のばらつきが生じないような対策が必要である。分担課題においては、オルガノイドを用いた試験結果における施設間でのばらつきについて基礎的なデータを蓄積する目的で、本年度は国立がん研究センターにて調製されたgpt deltaマウス肺オルガノイドを静岡県立大学へ輸送し、披験物質（アクリルアミド）の曝露後、細胞を

凍結保存することで次年度実施予定の試料を調製した。

B．研究方法

gpt deltaマウス肺オルガノイドは、12 wellプレート4 well分に培養された状態で国立がん研究センターより輸送（室温）された。受け取り後、直ちに1 mL/well肺用（d1）培地を加え37°CのCO₂インキュベーターで培養した。披験物質（アクリルアミド）が送付されてくるまでの間、培地が黄色くなる4 - 5日毎に継代した（3倍希釈）。余分な細胞は凍結保存（-80 °C）した。披験物質（アクリルアミド）の曝露時には、12 wellプレートに調製したマトリゲル上に350 μL/wellの細胞懸濁液（d0培地、30.77×10⁴ 個/mL）を播種し、そこへS9 mix（50 μg prtein/mL）と0 mM、0.28 mM、1.4 mMのアクリルアミドを含む肺用d0培地を350 μL加えた。翌日、培地を回収しPBS（1 mL/well）で洗浄後、70 μL/wellのマトリゲルを重層し37°Cで25分間固めた後、肺用d1培地（1 mL/well）を加えた。その後、培地が黄色くなる4 - 5日毎の継代時にアクリルアミド曝露を同様の方法で実施した（合計3回）。

C．研究結果

合計3回の曝露後に、継代培養により各濃度あたり6well分の細胞を回収し、ペレットの状態での-80°C保存した。

D．研究発表

1. 論文発表

Shimba Y, Togawa H, Senoo N, Ikeda M, Miyoshi N, Morita A, Miura S. Skeletal muscle-specific PGC-1α

overexpression suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Sci. Rep.*, (2019) 9, 4077.

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. of Toxicol.*, (2019) in press

Hashidume T, Sakano T, Mochizuki A, Ito K, Ito S, Kawarasaki Y, Miyoshi N. Identification of soybean peptide leginsulin variants in different cultivars and their insulin-like activities. *Sci. Rep.*, (2018) 8, 16847.

Yagi M, Nakatsuji Y, Maeda A, Ota H, Kamikubo R, Miyoshi N, Nakamura Y, Akagawa M. Phenethyl isothiocyanate activates leptin signaling and decreases food intake. *PLoS One.*, (2018) 13, e0206748.

Yoshikawa Y, Katayanagi Y, Kamiya M, Yamamoto Y, Fukutomi R, Imai S, Miyoshi N, Ohashi N. Tomato saponin supplementation ameliorates the development of experimental arthritis by regulating inflammatory responses. *J. Funct. Foods*, (2018) 49, 458-464.

Hashidume T, Sasaki K, Hirata J, Kato M, Yoshikawa Y, Iwasaki Y, Arai H, Miura S, Miyoshi N. Effects of sanyaku and its constituent diosgenin on the fasted and postprandial hypertriacylglycerolemia in high-fat-diet-fed KK-*A^y* mice. *J. Agric. Food. Chem.*, (2018) 66, 9968-9975.

Pervin M, Unno K, Ohishi T, Tanabe H, Miyoshi N, Nakamura Y. Beneficial effects of green tea catechins on brain function. *Molecules*, (2018) 23, E1297.

Miyoshi N. Biochemical properties of cholesterol aldehyde secosterol and its derivatives. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, (2018) 62, 107-114.

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.*, (2018) 38, 537-543.

2. 学会発表

川上真由子、橋詰力、三好規之：キノコ抽出物における骨格筋萎縮予防化合物の探索，第41回日本分子生物学会（横浜），2018年11月28-30日

橋詰力、永田光風、佐藤隆一郎、三好規之：横浜大豆タンパク質 コングリシニン摂取時の脂質組成解析，第41回日本分子生物学会（横浜），2018年11月28-30日

永田光風、橋詰力、伊藤圭祐、三浦進司、三好規之：TRPA1・TRPM8 を介した脂質組成変動によるロコモティブシンドローム予防法の検討，第41回日本分子生物学会（横浜），2018年11月28-30日

田島悠也、豊田武士、平山裕一郎、橋詰力、松下幸平、小川久美子、渡辺賢二、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之：膀胱発がん性芳香族アミン *o*-toluidine の代謝物分析と DNA 付加体 Metabolomics and DNA adductome analysis of urinary bladder carcinogen *o*-toluidine，日本環境変異原学会第47回大会（京都），2018年11月1-2日

久富優太、小田美光、下原千晶、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、八木孝司、梶村春彦、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜：コリバクチン産生大腸菌の *in vitro* 遺伝毒性試験，日本環境変異原学会第47回大会（京都），2018年11月1-2日

松山弘希、田中航、鈴木悠、三好規之、松浦靖、柚木崎千鶴子、宮崎達雄、道本英之、窄野昌信、榊原啓之：ApoE 欠損マウスを用いた天日干しダイコンの機能性の探索，平成30年度日本栄養・食糧学会 九週・沖縄支部大会（宮崎），2018年10月20-21日

豊田武士、山田貴宣、三好規之、小川久美子：芳香族アミン誘発ラット膀胱発がん過程の初期段階における遺伝子発現動態，第77回日本癌学会学術総会（大阪），2018年9月27-29日

平山裕一郎、田島悠也、恒松雄太、三好規之、若林敬二、渡辺賢二：検出困難な遺伝毒性物質コリバクチンを見出すためのDNA付加体の解析，日本生薬学会第65回大会（広島），2018年9月16-17日

吉川祐人、鈴木悠、橋詰力、高垣晶子、平山裕一郎、岸本真治、渡辺賢二、中村順行、原征彦、三好規之：ラット尿中の緑茶カテキン由来腸内細菌代謝物一斉分析，第23回日本フードファクター学会・第12回日本ポリフェノール学会・第15回日本カテキン学会・合同学術集会（京都），2018年9月7-8日

加藤麻衣、橋詰力、吉田卓矢、田村謙太郎、中村俊之、中村宜督、三好規之：自然薯および自然薯むかごにおける有効成分ジオスゲニンの定量分析，第23回日本フードファクター学会・第12回日本ポリフェノール学会・第15回日本カテキン学会・合同学術集会（京都），2018年9月7-8日

松山弘希、田中航、鈴木悠、三好規之、松浦靖、柚木崎千鶴子、宮崎達雄、道本英之、窄野昌信、榊原啓之：ApoE 欠損マウスを用いた天日干しダイコンの機能性の探索，第23回日本フードファクター学会・第12回日本ポリフェノール学会・第15回日本カテキン学会・合同学術集会（京都），2018年9月7-8日

日高楓、横山大悟、田中航、鈴木悠、三好規之、吹井伸二、杉田卓也、日高健太、窄野昌信、榊原啓之：マンゴ

ーに含まれる成分と抗酸化活性に及ぼす熟度の影響, 第23回日本フードファクター学会・第12回日本ポリフェノール学会・第15回日本カテキン学会・合同学術集会(京都), 2018年9月7-8日

梅林脩平、妹尾奈波、佐藤友紀、三好規之、吉田卓矢、守田昭仁、杉浦悠毅、井上菜穂子、亀井康富、三浦進司：骨格筋中リン脂質と骨格筋機能との関連の解明, 第73回日本体力医学会大会(福井), 2018年9月7-9日

梅林脩平、妹尾奈波、佐藤友紀、三好規之、吉田卓矢、守田昭仁、杉浦悠毅、井上菜穂子、亀井康富、三浦進司：骨格筋中リン脂質と骨格筋機能との関連の解明, 日本筋学会第4回学術集会(岡山), 2018年8月10-11日

三浦進司、妹尾奈波、梅林脩平、守田昭仁、三好規之、亀井康富：転写共役因子 PGC-1 によって制御される骨格筋リポオレチン, 日本筋学会第4回学術集会(岡山), 2018年8月10-11日

平山裕一郎、松崎信生、玉舟亮太、恒松雄太、佐藤道大、吉川悠子、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、若林敬二、武藤倫弘、石川秀樹、渡辺賢二大：腸がんリスク因子物質コリバクチンの生産菌検出に関する化学的研究, 第24回日本がん予防学会(高松), 2018年6月27-28日

豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、三好規之、若林敬二、小川久美子：膀胱がんリスク因子としてのノルハルマン代謝物:ラットを用いた検討, 第24回日本がん予防学会(高松), 2018年6月27-28日

河合柚子、橋詰力、眞鍋康子、藤井宣晴、中村宜督、三

好規之：食品因子 isothiocyanate 類が結合した炎症性サイトカイン MIF の機能解析, 第72回日本栄養・食糧学会大会(岡山), 2018年5月11-13日

加藤麻衣、橋詰力、庄司豊、庄司(加藤)久美子、五十嵐美樹、早川清雄、吉川悠子、三好規之：高脂肪食を摂取した NASH 肝発がんモデルマウス糞便中揮発性化合物の分析, 第72回日本栄養・食糧学会大会(岡山), 2018年5月11-13日

吉川悠子、恒松雄太、松崎信生、平山裕一郎、佐藤道大、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、若林敬二、渡辺賢二：大腸がん患者から分離された遺伝毒性物質コリバクチン陽性菌の解析 Prevalence of colibactin-positive bacteria in colorectal cancer patients, 第91回日本細菌学会総会(福岡), 2018年5月11-13日

E. 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

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

分担研究課題名：オルガノイドを用いた新規発がんモデルの作成

研究分担者 筆宝義隆 千葉県がんセンター・研究所・発がん制御研究部長

研究要旨

遺伝子変異の蓄積はがんの大きな特徴であり、近年のがんゲノム解析の進展に伴いすでに多数の異常が報告されている。しかし、そのうち遺伝子改変マウスの作製などにより個体レベルで実際のがんの原因であることが確認されたものはごく一部にとどまり、検証の迅速化が求められている。近年、3次元オルガノイド培養法の発達により様々な組織の正常細胞の培養が可能になったことを受けて、我々は様々な臓器由来のマウス正常細胞に対してレンチウイルスにより極めて高い効率で複数の遺伝子異常を再現する手法を確立し、ヌードマウス皮下において短期間で発がんを誘導する実験系の確立を進めている。発がん過程を細胞レベルで迅速に再現するため、発がん機構の詳細な解析を可能にするのみならず、個々の変異の発がん性への寄与度の検証や作製したがん細胞を用いた治療法の評価を容易にするなど、がん研究の様々な分野における高い有用性が期待されている。胃がんに関しては、がんで変異頻度が高い遺伝子の改変マウスによる発がんモデルは数が少なく、また化学発がんにも抵抗性であることが知られている。そこで、本年度は胃がんで変異頻度の高いT53、CDH1、KRASに着目し、マウス正常胃オルガノイドに単独または複数の遺伝子異常を再現することで、ヌードマウス皮下における腫瘍形成能を評価した。単独の異常では腫瘍形成に不十分であったが、複数の遺伝子異常を組み合わせることで腫瘍形成を認めた。組織学的には、主に管状腺癌で、p53欠失とCdh1ノックダウンの組合せでは一部に印環細胞を伴う例もあり、多彩な組織像を呈していた。このような結果は、様々な変異を伴う胃がんモデルの作製が実現可能なことを示唆しており、化学発がんモデルの作成にも道を開くものと考えられる。

A．研究目的

食品添加物等の生体における発がん性は従来動物への長期投与により評価されることが標準的だったが、時間と労力を要することや国際的な動物愛護運動の影響もあり、代替法の開発が喫緊の課題となっている。こうした状況に鑑みて、本研究班では大腸や肺などの複数の臓器において遺伝子変異を有するまたはノックダウンを行ったオルガノイドを用いた高感度の発がん性検出法の開発を進めている。これらの臓器はいずれも遺伝子変異の再構成のみでヌードマウス皮下に腫瘍形成が可能であることを確認済みであり、その上で一部の変異を化学物質に置き換えてアッセイを行うことがその研究の基本デザインとなっている。我々は、こうした実験系に利用可能な各臓器の拡大を目指しており、本研究班では特に化学発がん抵抗性として知られる胃がんについてオルガノイド発がんモデルの作成に取り組むこととした。

B．研究方法

（1）マウス胃オルガノイドの培養

マウスにおいては胃の口側半分は扁平上皮であり、ヒトの胃に相当するのは肛門側の腺胃にあたる。十分なマージンをもって腺胃を単離し、物理的な剪断と酵素処理によって上皮腺管を単離し、固化したマトリゲル上に散布する。メディウムは腸管同様、Advanced DMEM/F12にEGF、R-spondin1、Noggin、Y27632等を添加したものをを用いた。マウスとしてはp53のコンディショナルアレルのホモマウス（以下Trp53^{f/f}と表記する）、Krasのコンディショナルアレルのヘテロマウス（Kras^{LSL-G12D/+}）を用いた。

（2）レンチウイルス感染

ベクターとしてはpLK0.1のバックボーンにCreまたはshRNAを組み込んだものを使用した。HEK293FT細胞を用いてウイルスを作成し、濃縮・凍結を行い使用時に解凍した。オルガノイドの感染は完全に単一細胞にまで分散させた上で、マトリゲル上に一晚共培養することで行った。当該遺伝子の組み替えはゲノムPCRで確認し、標的遺伝子のノックダウンはpuromycinによる薬剤選択後にWestern blottingで確

認した。

(3) 造腫瘍の検証

1x10⁵個の細胞をオルガノイドのままマトリゲルと混和してヌードマウス皮下に移植し、8週間程度観察したのちに解剖を行い皮下腫瘍を単離した。半分を組織評価に用い、残りの半分は再びオルガノイド培養を行った。組織評価としては通常H&E染色を中心に一部免疫組織化学による評価を加えた。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験の実施にあたり「動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、平成24年最終改正法律第50号)」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号、平成25年最終改正環境省告示第84号)」及び「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日厚生労働省通知、平成27年2月20日一部改正)」を遵守した。また、千葉県がんセンター動物実験委員会の承認を得て実験を行った。実際の実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、屠殺は頸椎脱臼やイソフルラン麻酔下にて腹部大動・静脈からの脱血により行うなど動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号)等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認を得た後に実施した。

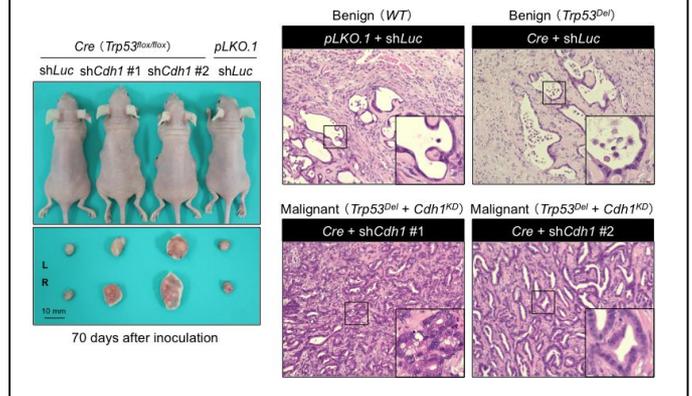
C. 研究結果

(1) Cdh1ノックダウン/p53欠失(図1)

すでにp53とCdh1の二重KOマウスにより胃がんが誘導されることが報告されていることから、同様の結果が得られるかオルガノイドを用いて検討した。まず、これまでの臓器での結果と違い、コントロールベクターを導入したオルガノイドでも常に小さいながら充実性の腫瘍が形成されるのが胃のモデルの特徴としてあげられる。これらの腫瘍は異型に乏しいほぼ正常の腺管で構成され、Ki-67陽性細胞も多数見られた。皮下接種後2ヶ月後にも関わらず増殖を継続する正常細胞の存在は予想外だったが、これらを再び培養したところ、オルガノイドとしては増殖することがなかったため、腫瘍には至っていないと結論づけた。また、Creによるp53のKOでもほぼ同様の結果であり造腫瘍性はないことを確認した。一方、Cdh1のノックダウンをp53KOに追加したところ、腺管の密度が著明に増加し、粘液産生を伴うものを多く認めた。また、一部の症例ではスキルス胃がんの特徴的とされる印環細胞(Signet-ring cell)の出現を認めるなど、in vivoでの生理的な環境下以外でも

同様の変化が誘導されることを確認した。これらの細胞の周囲では確かに細胞接着が低下していたが、基本的には腺癌と分類されるがんが誘導されていた。

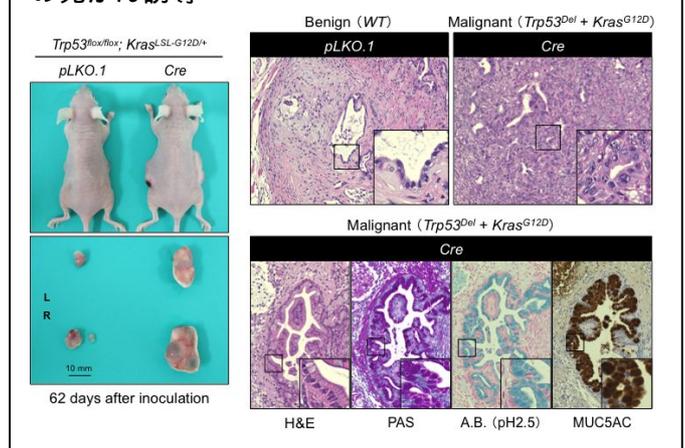
図1 p53KOとCdh1ノックダウンによるオルガノイドからの発がん誘導



(2) Kras活性化変異/p53欠失(図2)

胃がんにおける変異頻度ではp53が約半数で首位だが、Krasも10%程度に認められる。一方、これまでにp53KOとKras変異を胃特異的に再現したマウスは報告されていない。二重または三重変異マウスでの解析や論文化されていない学会発表等からの知見を総合するとp53KOとKras変異を組み合わせても他の臓器とは異なり胃がんが発症しない可能性が高いと推定された。また、このことは化学発がんが胃がん抵抗性であることと関連する可能性もあると考えられた。Kras変異単独では異型の腺管を有する腫瘍は誘導されなかったが、実際に両者の組み合わせをCreの導入によりオルガノイドレベルで検討したところ、分化型の腺癌が誘導され、in vivoとは異なる結果となった。このことから、p53KOとKras変異は協調的に発がんを誘導することが証明された。生体内の胃微小環境において発がん抑制的な要因が存在することが示唆された。

図2 p53KOとKras変異によるオルガノイドからの発がん誘導



D . 研究発表

1. 論文発表

(1) Ochiai M, Yoshihara Y, Maru Y, Tetsuya M, Izumiya M, Imai T, **Hippo Y.** Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgz024. [Epub ahead of print] 2019

(2) Maru Y, Onuma K, Ochiai M, Imai T, **Hippo Y.** Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoid. *Cancer Sci.* 110(3):858-866, 2019

2. 学会発表

(1)丸喜明、**筆宝義隆**:マウス胃オルガノイドへの包括的な遺伝子導入による胃発がん過程の再現、ポスター、第16回がんとハイポキシア研究会(2018年11月千葉)

(2)丸喜明、**筆宝義隆**:マウス胃細胞の3次元培養を用いた胃発がん過程の再現、ポスター、第27回日本

癌病態治療研究会(2018年5月千葉)

(3) Masashi Izumiya, Masako Ochiai, Yasunori Yoshihara, Yoshiaki Maru, Matsuura Tetsuya, Toshio Imai, **Yoshitaka Hippo**: Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids、口演、第33回発癌病理研究会(2018年8月御殿場)

(4)泉谷昌志、吉原靖典、丸喜明、落合雅子、松浦哲也、今井俊夫、**筆宝義隆**: 変異遺伝子の in vitro 再構成による胆管細胞発がんの誘導、ポスター、第77回日本癌学会学術総会(2018年9月大阪)

E . 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

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

分担研究課題名：オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備

研究分担者 平田暁大 岐阜大学・研究推進・社会連携機構・助教

研究要旨

本分担研究課題においては、マウス正常組織由来オルガノイドを用いる *in vitro* 発がん性短中期試験を多施設で実施可能な方法として確立することを目的に、施設間での輸送方法を検討するとともに、施設間での輸送がオルガノイドへ及ぼす影響について基礎的なデータを収集した。現在のところ、マウス正常組織から3次元培養法によりオルガノイドを調製する技術は幅広く行われてはならず、必要な試薬類にも高価なものが含まれる。そのため、マウスの生体からオルガノイドを調製する工程が本試験系の普及の障害となる可能性がある。他施設で調整済みのオルガノイドを用いて試験を実施することができれば、試験の実施にあたり、各施設で生体からオルガノイドを調整する必要はなくなり、試験法の普及に繋がることが期待される。本年度は、基幹施設（国立がん研究センター）で調整されたオルガノイドを輸送し、研究分担者の所属施設（岐阜大学）において培養を行い、施設間での輸送がオルガノイドへ及ぼす影響を検討した。野生型BALB/cマウス及び*p53*ヘテロノックアウト（*p53* (+/-)）マウス（BALB/c背景）由来の胆管および肺オルガノイドを用い、オルガノイドは細胞培養用プレートでマトリゲルに挟まれた状態で基幹施設から輸送した。分担者の所属施設において、到着後、速やかに培地を添加し、培養を続けた。胆管オルガノイドについては1回、肺オルガノイドを3回の輸送を行い、いずれの場合も輸送後に培養・継代が可能であった。受け取ったオルガノイドは1週間毎に継代を行い、胆管オルガノイドについては7回、肺オルガノイドについては9回継代を行った後も、オルガノイドは培養可能で、大きな形態学的な変化も生じないことを確認した。また、輸送後の培養・継代において、野生型と*p53* (+/-) のオルガノイドの間に明らかな違いは認められなかった。

以上、今回確立した方法でマウス由来オルガノイドの輸送は可能であることが示された。輸送後に培養したオルガノイドに形態学的な変化は認められなかったが、今後、実際に *in vitro* 発がん性短中期試験に用いた場合に、試験結果を忠実に再現できるか検討する必要がある。

A. 研究目的

食品添加物等の生体における遺伝毒性評価法として、レポーター遺伝子をマウス・ラットに導入した遺伝子突然変異検出系の開発により評価精度が向上したが、発がん性については長期試験の時間・使用動物削減・経費面の課題と短・中期試験からの予測による不確実性を克服する評価法の開発を要する。我々はマウスの大腸・肺等の正常組織から3次元培養法によりオルガノイドを調製し、臓器毎の発がん機序に基づく遺伝子改変操作を加えてヌードマウスに皮下移植すると腫瘍様組織を形成し、既知の発がん物質処置により当該組織の増殖活性・異型性・浸潤性を指標とする悪性化が誘導できることを見出した。本研究では、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウス、レポーター遺伝子導入マウス等から調製したオルガノイド系あるいはそれらにshRNAを用いて発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系につき、遺伝毒性試験法としての適用性と腫瘍性病変をエンドポイントとする発がん性試験法としての

妥当性を検証し、遺伝毒性・発がん性短期包括的試験法の開発を目指す。また、最終的に妥当性が検証されるとともに、多施設で実施可能な方法として確立できることが重要である。現在マウス正常組織から3次元培養法によりオルガノイドを調製する技術は幅広く行われてはならず、必要な試薬類にも高価なものが含まれる。しかし、経費面では長期発がん性試験に対比し十分な費用対効果が見込まれ、普及面では哺乳類培養細胞を用いる小核試験等のように、実施機関や技術者の基盤整備・技術訓練により普及した系も存在することから、本研究での成果は広く食品添加物等の安全性評価に活用可能と考えられる。一方、オルガノイドの調製条件の違いにより施設間で得られる試験結果のばらつきが生じないような対策が必要である。

今年度は、他施設で調製されたオルガノイドを用いて *in vitro* 発がん性短中期試験が実施可能であるか検討するため、施設間での輸送方法を検討するとともに、施設間での輸送がオルガノイドへ及ぼす影

響について基礎的なデータを収集した。他施設で調製済みのオルガノイドを用いることが可能になれば、施設間での試験結果のばらつきを抑えたより再現性の高い試験となることが期待され、さらに、各実施機関で生体からオルガノイドを調整する必要がなくなるため、オルガノイドを用いた試験法の普及に繋がることが期待される。

また、*p53*(+/-)マウスを含めたがん関連遺伝子改変マウス由来のオルガノイドを用いることで、*in vitro*発がん性短中期試験の検出感度が高まることが期待される。一方、遺伝子可変マウス由来のオルガノイドは輸送ストレスへの感受性も高いことも予想されるため、遺伝子改変のオルガノイドの輸送に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

(1) 施設間で輸送がオルガノイドに及ぼす影響の解析

1) オルガノイドの調製

オルガノイドの調整は、国立がん研究センターにておこなった。野生型 BALB/cマウスおよび*p53*(+/-)マウス(BALB/c背景)の胆管、肺からオルガノイドを調製した。調製手順の概略は次の通りである。

[1日目]

- 肝臓・肺を摘出、細切、酵素処理
- マトリゲル上に単離細胞を播種し液体培地にて1日間培養

[2日目]

- 液体培地を除きマトリゲルを重層
- マトリゲル上に液体培地を加え培養

[1週間目(オルガノイドの増殖程度で判断)]

- マトリゲルを除きオルガノイドを軽く破砕して継代
- 1日目、2日目と同様の操作により培養継続

2) オルガノイドの輸送

[1日目]

- 継代と同様の操作により軽く破砕したオルガノイドをマトリゲル上に播種し液体培地にて1日間培養

[2日目]

- 液体培地を除きマトリゲルを重層
- 細胞培養用プレートのまま、常温にて岐阜大学に送付

[3日目]

- 到着後、速やかにマトリゲル上に液体培地を加え培養

[1週間目]

- 国立がん研究センターと同様の操作により継代

)1日目、2日目と同様の操作により培養継続

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

胆管オルガノイドについては1回、肺オルガノイドを3回の輸送を行い、いずれの場合も輸送先の施設(岐阜大学)で培養が可能であった。いずれのオルガノイドについても、1週間毎に継代を行い、胆管オルガノイドについては7回、肺オルガノイドについては9回継代を行った後も、オルガノイドは培養可能で、大きな形態学的な変化も生じないことを確認した(写真1)。また、輸送後の培養・継代において野生型と*p53*(+/-)のオルガノイドの間に明らかな違いは認められなかった。また、これまで分担研究者はオルガノイドを培養した経験はなかったが、比較的容易にオルガノイドを培養することが可能であった。

以上より、今回確立した輸送方法により施設間のオルガノイドの受け渡しが可能で、他施設で調製されたオルガノイドを用いて*in vitro*発がん性短中期試験が実施可能であることが示唆された。今後、実際に*in vitro*発がん性短中期試験に用いた場合に、試験結果を忠実に再現できるか検討する必要がある。現在、輸送後、培養・継代された肺オルガノイドを用いてアクリルアミドに対する試験を実施し、基幹施設で行った試験の結果が再現できるか検討している。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tsuchiya Y, Sakai H, [Hirata A](#), and Yanai T. Brazilian green propolis suppresses acetaminophen-induced hepatocellular necrosis by modulating inflammation-related factors in rats. *J. Toxicol. Pathol.* 31(4), 275-82, 2018.
- (2) Tsuchiya Y, Sakai H, [Hirata A](#), and Yanai T. Effects of food restriction on the expression of genes related to acetaminophen-induced liver toxicity in rats. *J. Toxicol. Pathol.* 31(4), 267-74, 2018.
- (3) Goto M, Yonemaru K, [Hirata A](#), Furuhashi H, Yanai T, and Sakai H. Lingual ganglioneuroma in a dog. *J. Vet. Med. Sci.* 80(3), 488-91, 2018.
- (4) [Hirata A](#)*, Kaneko A, Sakai H, Nakamura S, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, Suzuki J. Laryngeal B cell lymphoma in a juvenile Japanese Macaques (*Macaca fuscata*). *J. Comp. Pathol. in press*

(5) Goto M, Owaki K, Hirata A, Yanai T, and Sakai H. Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis to canine hemangiosarcoma cells *in vitro*. *Vet. Comp. Oncol. in press*

(6) Hirata A*, Miyamoto Y, Kaneko A, Sakai H, Yoshizaki K, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, and Suzuki J. Hepatic Neuroendocrine Carcinoma in a Japanese Macaques (*Macaca fuscata*). *J. Med. Primatol.*, 48(2), 137-40, 2019.

2. 学会発表
該当なし

E . 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。

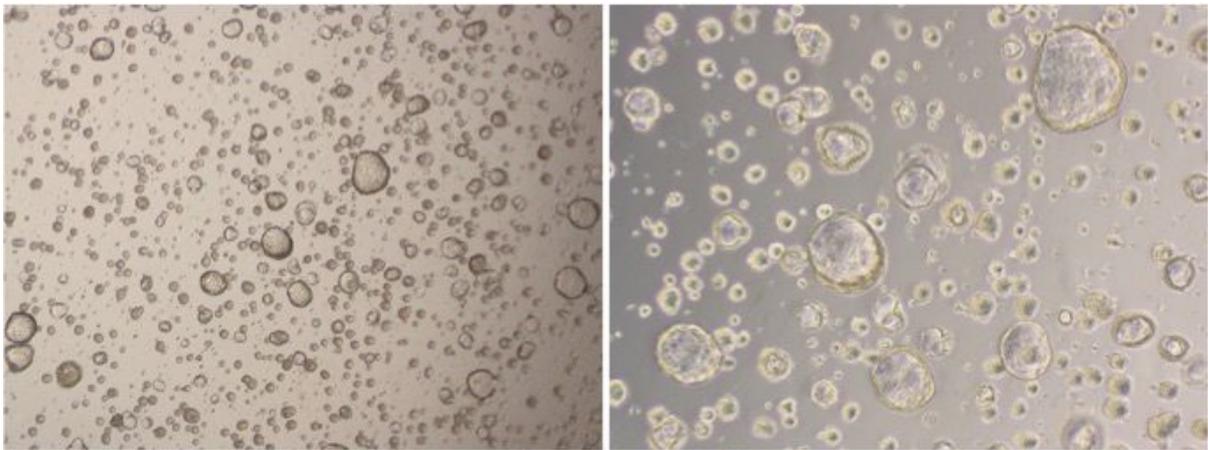


写真1. *p53*ヘテロノックアウトマウス由来肺オルガノイド(輸送後、8回培養後。左:低倍像、右:高倍像)。

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
本間正充	化学物質毒性ビッグデータベースと、インシリコによる毒性予測	日本学会議	IT・ビッグデータと薬学	公益財団法人日本学術協力財団	東京	2019	89-100

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
Gadaleta D, Porta N, Vrontaki E, Mangano S, Manganaro A, Sello G, Honma M, Benfenati E.	Integrating computational methods to predict mutagenicity of aromatic azo compounds.	J Environ Sci Health C Environ Ecotoxicol Rev.	35	239-257	2017
Mishima M, Hashizume T, Haranosono Y, Nagato Y, Takeshita K, Fukuchi J, and Homma M.	Meeting report, ICH M7 relevant workshop: use of (Q)SAR systems and expert judgment.	Genes and Environment	40	19	2018
Benfenati E, Golbarnaki A, Raitano G, Roncaglioni A, Mangano S, Lemke F, Nozler U, Lo Piparo E, Honma M, Manganaro A, Gini G.	A large comparison of integrated SAR/QSAR models of the Ames test for mutagenicity.	SAR QSAR Environ Res.	29	591-611	2018

<p>Myatt GJ, Ahlberg E, Akhori Y, Allen D, Amberg A, Anger LT, Aptula A, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Burden N, Cammerer Z, Cronin MTD, Cross KP, Custer L, Dettwiler M, Dobo K, Ford KA, Fortin MC, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gervais V, Glover KP, Glowienke S, Van Gompel J, Gutsell S, Hardy B, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Hughes K, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kim MT, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Majer B, Masten S, Miller S, Moser J, Mumtaz M, Muster W, Neilson L, Oprea TI, Patlewicz G, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Ruiz P, Schilter B, Serafimova R, Simpson W, Stavitskaya L, Stidl R, Suarez-Rodriguez D, Szabo DT, Teasdale A, Trejo-Martin A, Valentin JP, Vuorinen A, Wall B A, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Hasselgren C.</p>	<p>In silico toxicology protocols</p>	<p>Regul Toxicol Pharmacol.</p>	<p>96</p>	<p>1-17</p>	<p>2018</p>
<p>Honma M, Kitazawa A, Cayley A, Williams RV, Barber C, Hanser T, Saikhov R, Chakravarti S, Myatt GJ, Cross KP, Benfenati E, Raitano G, Mekenyan O, Petkov P, Bossa C, Benigni R, Battistelli CL, Giuliani A, Tcheremenskaia O, DeMeo C, Norinder U, Koga H, Jose C, Jeliaskova N, Kochev N, Paskaleva V, Yang C, Daga PR, Clark RD, Rathman J.</p>	<p>Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity: outcomes of the Ames/QSAR International Challenge Project.</p>	<p>Mutagenesis.</p>	<p>34</p>	<p>3-16</p>	<p>2019</p>

Fukuchi J, Kitazawa A, Hirabayashi K, Honma M.	A practice of expert review by read-across using QSAR Toolbox.	Mutagenesis	34	49-54	2019
Petkov PI, Schultz TW, Honma M, Yamada T, Kaloyanova E, Mekenyan OG.	Validation of the performance of TIMES genotoxicity models with EFSA pesticide data.	Mutagenesis	34	83-90	2019
Tennant RE, Guesné SJ, Canipa S, Cayley A, Drewe WC, Honma M, Masumura K, Morita T, Stalford SA, Williams RV.	Extrapolation of in vitro structural alerts for mutagenicity to the in vivo endpoint.	Mutagenesis	34	111-121	2019
You X, Ando T, Xi J, Cao Y, Liu W, Zhang X, Honma M, Masumura K, Luan Y.	Gene mutation and micronucleus assays in <i>gpt</i> delta mice treated with 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether.	Mutagenesis	33	153-160	2018
Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S.	<i>In vivo</i> positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats.	Archives of Toxicology	92	3207-3221	2018
Aoki Y, Nakajima D, Matsumoto M, Yagishita M, Matsumoto M, Yanagisawa R, Goto S, Masumura K, Nohmi T.	Change over time of the mutagenicity in the lungs of <i>gpt</i> delta transgenic mice by extract of airborne particles collected from ambient air in the Tokyo metropolitan area.	Genes and Environment	40	25	2018
Hori H, Shimoyoshi S, Tanaka Y, Momonami A, Masumura K, Yamada M, Fujii W, Kitagawa Y	Integration of micronucleus tests with a gene mutation assay in F344 <i>gpt</i> delta transgenic rats using benzo[a]pyrene.	Mutation Res.	837	1-7	2019
Maru Y, Onuma K, Ochiai M, Imai T, Hippo Y.	Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoid.	Cancer Sci.	110	858-866	2019
Ochiai M, Yoshihara Y, Maru Y, Tetsuya M, Izumiya M, Imai T, Hippo Y.	Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids.	Carcinogenesis		doi:10.1093/carcin/bgz024.	2019

Machida Y, Sudo Y, Uchiya N, Imai T.	Increased susceptibility to mammary carcinogenesis and an opposite trend in endometrium in <i>Trp53</i> heterozygous knockout female mice by back-crossing the BALB/c strain onto the background C3H strain.	J. Toxicol. Pathol.		https://doi.org/10.1293/tox.2018-0057	2019
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.	109,	1024-1031.	2018
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.	Journal of Applied Toxicology	38	537-543.	2018
Hori, M., Mutoh, M., Ishigamori, R., Imai, T., Takahashi, M.	Activated ductal proliferation induced by <i>N</i> -nitrosobis(2-oxopropyl)amine in fat-infiltrated pancreas of KK- <i>Ay</i> mice.	In Vivo	32	499-505	2018
Hattori, N., Niwa, T., Ishida, T., Kobayashi, K., Imai, T., Mori, A., Kimura, K., Mori, T., Asami, Y., Ushijima, T.	Antibiotics suppress colon tumorigenesis through inhibition of aberrant DNA methylation in an AOM/DSS colitis model.	Cancer Sci.	110	147-156	2019
Machida, Y., Sudo, Y., Uchiya, N., Imai, T.	Increased susceptibility to mammary carcinogenesis and an opposite trend in endometrium in <i>Trp53</i> heterozygous knockout female mice by back-crossing the BALB/c strain onto the background C3H strain.	J. Toxicol. Pathol.			in press, 2019

Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL.	High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT).	Mutation Res.			in press, 2019
Shimba Y, Togawa H, Senoo N, Ikeda M, Miyoshi N, Morita A, Miura S.	Skeletal muscle-specific PGC-1 α overexpression suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice.	Sci. Rep.	9	4077	2019
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. of Toxicol.			in press, 2019
Hashidume T, Sakano T, Mochizuki A, Ito K, Ito S, Kawarasaki Y, Miyoshi N.	Identification of soybean peptide leginsulin variants in different cultivars and their insulin-like activities.	Sci. Rep.	8	16847	2018
Yagi M, Nakatsuji Y, Maeda A, Ota H, Kamikubo R, Miyoshi N, Nakamura Y, Akagawa M.	Phenethyl isothiocyanate activates leptin signaling and decreases food intake.	PLoS One.	13	e0206748	2018
Yoshikawa Y, Katayanagi Y, Kamiya M, Yamamoto Y, Fukutomi R, Imai S, Miyoshi N, Ohashi N.	Tomato saponin supplementation ameliorates the development of experimental arthritis by regulating inflammatory responses.	J. Funct. Foods	49	458-464	2018
Hashidume T, Sasaki K, Hirata J, Kato M, Yoshikawa Y, Iwasaki Y, Arai H, Miura S, Miyoshi N.	Effects of sanyaku and its constituent diosgenin on the fasted and postprandial hypertriacylglycerolemia in high-fat-diet-fed KK-Ay mice.	J. Agric. Food. Chem.	66	9968-9975	2018

Pervin M, Unno K, Ohishi T, Tanabe H, Miyoshi N, Nakamura Y.	Beneficial effects of green tea catechins on brain function.	Molecules	23	E1297	2018
Miyoshi N.	Biochemical properties of cholesterol aldehyde secosterol and its derivatives.	J. Clin. Biochem. Nutr.	62	107-114	2018
Tsuchiya Y, Sakai H, Hirata A, and Yanai T.	Brazilian green propolis suppresses acetaminophen-induced hepatocellular necrosis by modulating inflammation-related factors in rats.	J. Toxicol. Pathol.	31	275-282	2018
Tsuchiya Y, Sakai H, Hirata A, and Yanai T.	Effects of food restriction on the expression of genes related to acetaminophen-induced liver toxicity in rats.	J. Toxicol. Pathol.	31	267-274	2018
Goto M, Yonemaru K, Hirata A, Furuhashi H, Yanai T, and Sakai H.	Lingual ganglioneuroma in a dog.	J. Vet. Med. Sci.	80	488-491	2018
Hirata A, Kaneko A, Sakai H, Nakamura S, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, Suzuki J.	Laryngeal B cell lymphoma in a juvenile Japanese Macaques (<i>Macaca fuscata</i>).	J. Comp. Pathol.			in press
Goto M, Owaki K, Hirata A, Yanai T, and Sakai H.	Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis to canine hemangiosarcoma cells in vitro.	Vet. Comp. Oncol.			in press
Hirata A, Miyamoto Y, Kaneko A, Sakai H, Yoshizaki K, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, and Suzuki J.	Hepatic Neuroendocrine Carcinoma in a Japanese Macaques (<i>Macaca fuscata</i>).	J. Med. Primatol.	48	137-140	2019

平成 31 / 年 3 月 28 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30-食品一般-003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 変異遺伝部 部長
(氏名・フリガナ) 本間 正充 (ホンマ マサミツ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェック。一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成 31 年 3 月 28 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30-食品一般-003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 変異遺伝部 室長
(氏名・フリガナ) 安井 学 (ヤスイ マナブ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (*1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (*2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (*3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(*1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(*2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(*3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成 31 年 3 月 28 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30-食品-一般-003)
- 研究者名 (所属部局・職名) 変異遺伝部 室長
(氏名・フリガナ) 増村 健一 (マスムラ ケンイチ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし、一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成 31 年 3 月 28 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30-食品-一般-003)
- 研究者名 (所属部局・職名) 病理部 客員研究員
(氏名・フリガナ) 西川 秋佳 (ニシカワ アキヨシ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成 30 年 3 月 28 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30-食品-一般-003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 病理部 部長
(氏名・フリガナ) 小川 久美子 (オガワ クミコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成 31 年 3 月 28 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30-食品-一般-003)
- 研究者名 (所属部局・職名) 病理部 室長
(氏名・フリガナ) 石井 雄二 (イシイ ユウジ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし、一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成 31 年 2 月 28 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30-食品-一般-003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 病理部 主任研究官
(氏名・フリガナ) 高須 伸二 (タカス シンジ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関における COI の管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関における COI 委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係る COI についての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係る COI についての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口をチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2019年 4月 1日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法人国立がん研究センター

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 中金 斉

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 研究所・動物実験施設長
(氏名・フリガナ) 今井 俊夫・イマイ トシオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立がん研究センター	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法人国立がん研究センター
 所属研究機関長 職 名 理事長
 氏 名 中釜 斉

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 研究所・動物実験部門・外来研究員
 (氏名・フリガナ) 落合 雅子・オチアイ マサコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立がん研究センター	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
 (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2019年 4月 1日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法人国立がん研究センター
 所属研究機関長 職 名 理事長
 氏 名 中釜 斉

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 研究所 発がん・予防研究分野・ユニット長
 (氏名・フリガナ) 戸塚 ゆ加里・トツカ ユカリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立がん研究センター	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
 (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 静岡県立大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 鬼頭 宏



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 静岡県立大学食品栄養科学部 准教授
(氏名・フリガナ) 三好 規之 (ミヨシ ノリュキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

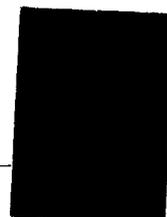
(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 千葉県がんセンター

所属研究機関長 職 名 病院長

氏 名 山口 武人



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 研究所発がん制御研究部 部長
(氏名・フリガナ) 筆宝義隆 (ヒッポウヨシタカ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項) _____

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人岐阜大学
 所属研究機関長 職 名 学長
 氏 名 森脇 久隆

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 研究推進・社会連携機構 (科学研究基盤センター)・助教
(氏名・フリガナ) 平田 暁大・ヒラタ アキヒロ
- 倫理審査の状況 該当性の有無が有の場合は、審査を受けた研究課題番号を記載 : 承認番号 H30-153

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	岐阜大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)