

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究研究事業

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究

平成30年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鰐淵 英機

令和元(2019)年 5月

## 目 次

I . 総括研究報告	
化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究	----- 1
鰐淵英機	
II . 分担研究報告	
1 . 病理組織発がんマーカーを用いた中期発がんリスク評価法の確立： 膀胱発がん物質の評価	----- 10
豊田武士	
2 . 病理組織発がんマーカーを用いた中期発がんリスク評価法の確立： 膀胱発がん物質の評価	----- 15
鈴木周五	
3 . 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立： 肝発がん物質の評価	----- 18
魏 民	
4 . 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立： 肝発がん物質の評価	----- 20
横平政直	
5 . 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立： 肝発がん物質の評価	----- 26
塚本徹哉	
6 . 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立： 肝発がん物質の評価	----- 28
鰐淵英機	
7 . 網羅的なDNA付加体解析法を用いた化学物質のDNA損傷性評価： 肝発がん物質の評価	----- 31
戸塚ゆ加里	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 36

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

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

研究代表者 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 教授

## 研究要旨

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

## 研究分担者

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

## A . 研究目的

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

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

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

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

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

## B . 研究方法

### 1 . -H2AX を用いた膀胱発がんリスク評価法の確立 (豊田、鈴木)

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

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

には、同物質への発がん感受性が高い雌 F344 ラットを用いた。

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

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

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

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

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

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

### 3 . DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価 (鰐淵、戸塚)

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

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

#### (倫理面への配慮)

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

### C . 研究結果

#### 1 . -H2AX を用いた膀胱発がんリスク評価法の確立 (豊田、鈴木)

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

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

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

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

表 1 . 遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた判定結果

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

#### 3 . DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価 (鰐淵、戸塚)

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

いることが推測される。

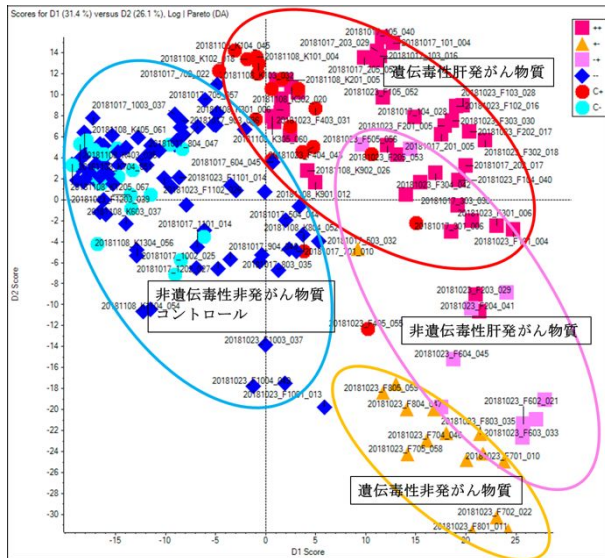


図 1. 化学物質投与したラット肝臓における DNA 損傷性の評価(PCA-DA 解析による)

### D. 考察

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

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

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

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

遺伝毒性肝発がん物質検出モデルの検証では、肝臓を

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

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

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

表 2. 遺伝毒性肝発がん物質の判定結果および TD50 との関係

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



OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME  
Standard Project Submission Form

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

---

PROJECT TITLE

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

SUBMITTED BY (Country / European Commission / Secretariat)

Japan

DATE OF SUBMISSION TO THE SECRETARIAT

31 October 2018

---

DETAILS OF LEAD COUNTRY/CONSORTIUM

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

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

## E. 結論

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

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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

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

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



- 32) Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Hashimoto N, Kanie S, Yoshida S, Imaida K., Characteristics of surfactant proteins in tumorigenic and inflammatory lung lesions in rodents. *J. Toxicol. Pathol.*, 31(4): 231-40. 2018.
- 33) Fukai, E, Sato, H, Watanabe, M, Nakae, D; , Totsuka, Y, Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.* 2018; 109: 1024-31.
- 34) Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology.* 2018; 38: 537-43.
- 35) Yokohira M, Nakano-Narusawa Y, Yamakawa K, Hashimoto N, Yoshida S, Kanie S, Imaida K. Validating the use of napsin A as a marker for identifying tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in rodents. *Exp Toxicol Pathol.* 2017; 69(8): 637-42.
- 36) Kanie S, Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Yoshida S, Hashimoto N, Imaida K. Suppressive effects of the expectorant drug ambroxol hydrochloride on quartz-induced lung inflammation in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2017; 30(2): 153-59.
2. 学会発表
- 1) 鰐淵英機, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 奥野高裕. 環境化学物質による発がん細胞傷害・修復の破綻. 第107回日本病理学会総会、北海道(2018年6月)(ワークショップ)
- 2) 梯アンナ, 石井真美, 奥野高裕, 魏民, 鰐淵英機. 非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の肝細胞と肝がんにおけるプロテオーム解析. 第107回日本病理学会総会、北海道(2018年6月)
- 3) 奥野高裕, 石井真美, 梯アンナ, 魏民, 鰐淵英機. NASH由来の肝細胞癌におけるmTORの活性化. 第107回日本病理学会総会、北海道(2018年6月)
- 4) 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 奥野高裕, 鰐淵英機. 職業性胆管がんにおける疫学のおよび動物モデルでの知見. 第25回日本がん予防学会学術総会、香川(2018年6月)
- 5) 行松直, 奥野高裕, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 鰐淵英機. o-Acetoacetotoluidideによる膀胱に対する毒性の検討. 第33回発癌病理研究会、静岡(2018年8月)
- 6) 藤岡正喜, 魏民, 奥野高裕, 行松直, 大石裕司, 梯アンナ, 鰐淵英機. 有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid のマウス経胎盤ばく露による発がん機序の検討. 第77回日本癌学会学術総会、大阪(2018年9月)
- 7) 奥野高裕, 行松直, 藤岡正喜, 梯アンナ, 魏民, 鰐淵英機. Acetoaceto-o-toluidide はラット膀胱上皮細胞の増殖とDNA傷害を誘発する. 第77回日本癌学会学術総会、大阪(2018年9月)
- 8) 梯アンナ, 石井真美, 奥野高裕, 藤岡正喜, 多胡善幸, 魏民, 鰐淵英機. メタボリックシンドロームモデル TSOD マウスにおける NASH 肝臓組織及び腫瘍のメタボローム解析. 第77回日本癌学会学術総会、大阪(2018年9月)
- 9) 魏民, 藤岡正喜, 奥野高裕, 行松直, 山口貴嗣, 梯アンナ, 鰐淵英機. ラットにおける1,4-dioxaneの変異原性と発がん性の定量的解析. 第77回日本癌学会学術総会、大阪(2018年9月)
- 10) 藤岡正喜, 魏民, 奥野高裕, 行松直, 大石裕司, 梯アンナ, 鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 日本毒性学会生体金属部会主催メタルバイオサイエンス研究会2018、宮城(2018年11月)
- 11) 奥野高裕, 行松直, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 鰐淵英機. 職業性膀胱癌に関わるヒト膀胱癌の特徴と実験病理学的解析. 第18回分子予防環境医学研究会大会、愛知県(2019年1月)
- 12) 行松直, 奥野高裕, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 鰐淵英機. o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性、発がんプロモーション作用の検討. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都(2019年1月)
- 13) 山口貴嗣, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸のF344ラットにおける慢性毒性試験及び発がん性試験. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都(2019年1月)
- 14) 魏民, 藤岡正喜, 行松直, 奥野高裕, 山口貴嗣, 梯アンナ, 鰐淵英機. BBN誘発マウス膀胱がんモデルにおけるAcetazolamideの予防効果の検討. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都(2019年2月)
- 15) 梯アンナ, 石井真美, 奥野高裕, 多胡善幸, 藤岡正喜, 魏民, 鰐淵英機. NASHモデルTSODマウスにおける肝臓腫瘍および肝臓組織のメタボローム解析. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都(2019年2月)
- 16) 藤岡正喜, 魏民, 奥野高裕, 行松直, 梯アンナ, 大石裕司, 鰐淵英機. 有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の経胎盤ばく露によるマウス肺発がん過程におけるヒストン修飾異常. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都(2019年2月)
- 17) 野村祐介, 藤澤彩乃, 松下幸平, 豊田武士, 福井千恵, 森下裕貴, 小川久美子, 鄭雄一, 中村義一, 靄島由二. RNAアプタマーを利用した機能性医療材料開発. 日本薬学会第139年会、千葉(2019年3月)
- 18) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Effects of N-acetyl-L-cysteine on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice.

- 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore (2019.3)
- 19) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子．膀胱発がん物質投与初期における遺伝子発現解析および新規膀胱発がんマーカーの探索．第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、2019年2月1日
  - 20) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子．膀胱発がん物質投与初期における遺伝子発現解析および新規膀胱発がんマーカーの探索．第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2019年2月）
  - 21) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子．1,3-Dichloro-2-propanol のF344ラットを用いた28日間反復強制経口投与による毒性プロファイルの検索．第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2019年2月）
  - 22) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子．膀胱発がん物質投与による-H2AX形成の用量相関性及び経時的変化．第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2019年2月）
  - 23) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子．C57BL/6J野生型およびPol欠損マウスにおけるベンゾ[a]ピレンおよび-Naftofラボン併用投与の効果．第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2019年1月）
  - 24) 曹永晩、水田保子、赤木純一、豊田武士、井手鉄哉、小川久美子．腹腔内投与銀ナノ粒子によるBALB/cマウスの急性毒性における抗酸化剤の影響．第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2019年1月）
  - 25) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Metabolomics and DNA adductome analysis of urinary bladder carcinogen *o*-toluidine. The 23rd Shizuoka Forum on Health and Longevity, Shizuoka (2018.11)
  - 26) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Metabolomics and DNA adductome analysis of urinary bladder carcinogen *o*-toluidine. The 4th International Conference on Pharma-food General Information, Shizuoka (2018.11)
  - 27) Akagi J, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Yokoi M, Hanaoka F, Ohmori H, Ogawa K. Benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis in Pol<sup>-</sup>knockout mice. 3R&3C Symposium, Kanazawa (2018.11)
  - 28) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、中村義一、齋島由二．RNAアプタマーを用いた新規骨再生用材料のin vivo性能評価．第40回日本バイオマテリアル学会大会、神戸（2018年11月）
  - 29) 野村幸世、豊田武士、菅原寧彦．胃癌バイオマーカーとしての血清TFF3の起源とその上昇機序の解明．第22回日本肝臓学会大会、神戸（2018年11月）
  - 30) 田島悠也、豊田武士、平山裕一郎、橋詰力、松下幸平、小川久美子、渡辺賢二、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之．膀胱発がん性芳香族アミン*o*-toluidineの代謝物分析とDNA付加体．日本環境変異原学会第47回大会、京都（2018年11月）
  - 31) 降旗千恵、豊田武士、小川久美子、鈴木孝昌．RNA-Seqによる1,4-ジオキサン(D0)のラット肝臓における遺伝子発現プロファイル：遺伝毒性および非遺伝毒性肝発がん物質との比較．日本環境変異原学会第47回大会、京都（2018年11月）
  - 32) 豊田武士、山田貴宣、三好規之、小川久美子．芳香族アミン誘発ラット膀胱発がん過程の初期段階における遺伝子発現動態．第77回日本癌学会学術総会、大阪（2018年9月）
  - 33) 山田貴宣、豊田武士、小川久美子．幹細胞マーカー免疫染色による膀胱発がん物質の早期検出．第77回日本癌学会学術総会、大阪（2018年9月）
  - 34) 保田智彦、吉田寛、内田英二、豊田武士、瀬戸泰之、野村幸世．MEK阻害剤によるヘリコバクター・ピロリ菌感染スナネズミ胃粘膜の回復．第77回日本癌学会学術総会、大阪（2018年9月）
  - 35) 保田智彦、Qing Yang、豊田武士、Eunyoung Choi、内田英二、吉田寛、瀬戸泰之、James R. Goldenring、野村幸世．MEK阻害剤Selumetinibによる*H. pylori*感染スナネズミ胃粘膜における化生粘膜の回復．第27回消化器疾患病態治療研究会、高知（2018年9月）
  - 36) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Tamehiro N, Kimura Y, Adachi R, Ogawa K. Dose-dependent sensitization effects of transcutaneously exposed acid-hydrolyzed wheat protein. 16th European Congress of Toxicologic Pathology, Brussels (2018.9)
  - 37) 豊田武士、山田貴宣、鈴木周五、松下幸平、曹永晩、赤木純一、森川朋美、水田保子、西川秋佳、小川久美子．-H2AXを指標とした化学物質の膀胱発がん性早期検出系の開発．第33回発癌病理研究会、御殿場（2018年8月）
  - 38) 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二．芳香族アミン類の代謝物分析とDNA付加体．第33回発癌病理研究会、御殿場（2018年8月）
  - 39) 豊田武士、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、小川久美子．膀胱発がん性芳香族アミンの短期投与によるラット膀胱粘膜遺伝子発現動態への影響．第45回日本毒性学会学術年会、大阪（2018年7月）
  - 40) 曹永晩、赤木純一、水田保子、豊田武士、小川久美子．コレラトキシン及びコレラトキシンBサブユニットの経皮曝露感作性試験におけるアジュバントとしての可能性．第45回日本毒性学会学術年会、大阪（2018年7月）
  - 41) 山田貴宣、豊田武士、曾根瑞季、鈴木周五、松下

- 幸平、森川朋美、小川久美子 . -H2AX を指標とした膀胱発がん性の早期予測 - 追加の化学物質による検証 - . 第 45 回日本毒性学会学術年会、大阪 (2018 年 7 月)
- 42) 豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、三好規之、若林敬二、小川久美子 . 膀胱がんリスク因子としてのノルハルマン代謝物：ラットを用いた検討 . がん予防学術大会 2018 高松、高松 (2018 年 6 月)
- 43) Nomura S, Yasuda T, Yang Q, Toyoda T, Choi E, Uchida E, Seto Y, Goldenring JR. Amelioration of metaplasia and re-emergence of normal gastric lineages after treatment of *H. pylori* infected gerbils with a MEK inhibitor. Digestive Disease Week 2018, Washington (2018.6)
- 44) 森川朋美、松下幸平、豊田武士、山田貴宣、高橋美和、井上薫、小川久美子 . ラットを用いた 2-エチルブタナールの 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験 . 日本食品化学学会第 24 回総会・学術大会、東京 (2018 年 5 月)
- 45) 野村幸世、豊田武士、大津洋、石橋祐子、愛甲丞、長田梨比人、市田晃彦、菅原寧彦、國土典弘、瀬戸泰之 . 胃癌、膵癌、乳癌早期発見バイオマーカーとしての血清 TFF3 とその起源の解明 . 第 118 回日本外科学会定期学術集会、東京 (2018 年 4 月)
- 46) 鈴木周五、他、ラット膀胱発がんに対するニコチンの影響、第 107 回日本病理学会総会、2017 年 6 月、札幌 .
- 47) 鈴木周五、他、ラット膀胱発がんに対するニコチンの影響、第 77 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月、大阪 .
- 48) 鈴木周五、他、ラット膀胱発がんに対するニコチンの影響、第 35 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2019 年 1 月、東京 .
- 49) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、ファインチューニングした Deep Convolutional Neural Networks によるヒト肺癌細胞像の自動分類 . 第 107 回日本病理学会総会、札幌 (2018 年 6 月)
- 50) 横平政直、肺胞サーファクタントの役割と発癌リスク評価への応用 (The Role of Surfactant proteins and the Application for Assessment of the risk of Carcinogenesis) 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、日本毒性病理学会、沖縄、2018.01
- 51) 横平政直、肺過形成性病変の発癌リスク評価における napsin A の発現と予防作用検出の試み、がん予防学術大会 2018 高松、がん予防学会、2018.06
- 52) Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics (コルカタ、2018 年 1 月)
- 53) 戸塚ゆ加里、秋場 望、佐藤春菜、前迫有也、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、十時泰、柴田龍弘、中釜 斉：全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第 33 回発がん病理研究会 (御殿場、2018 年 8 月)
- 54) Totsuka Y, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Nakagama H: Whole genome sequencing analysis elucidates the interaction between environmental factors and causes of human cancer . 第 77 回日本癌学会総会(大阪、2018 年 9 月)
- 55) 齋藤春五、高橋沙奈衣、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊：ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第 77 回日本癌学会総会 (大阪、2018 年 9 月)
- 56) 高橋沙奈衣、齋藤春五、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊：Fe<sup>3</sup>O<sub>4</sub> ナノ粒子の曝露された癌細胞における microRNAs のプロファイリングについて (II) 第 77 回日本癌学会総会 (大阪、2018 年 9 月)
- 57) 戸塚ゆ加里、佐藤春菜、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、遠藤 治：全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
- 58) 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里：マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
- 59) 前迫侑也、椎崎一宏、高村岳樹、戸塚ゆ加里：職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析) 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
- 60) 神尾翔真、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：ナノマテリアルの表面修飾が及ぼす遺伝毒性への影響 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
- 61) 齋藤春吾、渡邊昌俊、戸塚ゆ加里：ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
- 62) 石野孔祐、前迫侑也、内藤善哉、戸塚ゆ加里：質量分析データに基づく DNA 付加体データベースの整備 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)

## G. 知的所有権の取得状況

### 1 . 特許取得

該当なし

### 2 . 実用新案登録

該当なし

### 3 . その他

該当なし

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

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）  
分担研究項目：病理組織発がんマーカーを用いた中期発がんリスク評価法の確立：膀胱発がん物質の評価

研究分担者 豊田武士 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

## 研究要旨

本研究では、病理組織発がんマーカーとして -H2AX を用いた短期膀胱発がんリスク評価法の確立を目指す。平成 30 年度は、6 週齢の雄 F344 ラットに膀胱発がん物質等新規化学物質 5 種を 28 日間経口投与し、膀胱粘膜における -H2AX 形成を検索した。また、以前の検討で -H2AX 形成の増加を示さなかった偽陰性物質 4 種について、投与条件を変更した再検討を実施した。その結果、新規物質のうち膀胱発がん物質 1 種（2-Nitrosotoluene; 2-NT）および再検討物質のうち 1 種（ニトリロ三酢酸三ナトリウム一水和物；NTA）で、-H2AX 陽性細胞の有意な増加が確認された一方、膀胱を標的としない発がん物質では対照群と同じレベルにとどまった。これまでに蓄積されたデータを総合すると、-H2AX 免疫染色によって化学物質のラット膀胱に対する発がん性を、感度 84.4%（27/32）および特異度 100%（22/22）と、高い精度で予測できることが示された。以上の結果を受けて、化学物質の膀胱発がん性早期検出を目的とした「膀胱における -H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与毒性試験に対する既存の OECD テストガイドライン（TG 407）に、オプションとして追加する改定案（Standard Project Submission Form; SPSF）を厚生労働省を通じて提出した。

## A．研究目的

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

平成 30 年度は、膀胱発がん物質等新規化学物質 10 種類（名古屋市立大と分担）についてラット 28 日間反復経口投与試験を実施し、-H2AX の膀胱発がん性早期検出指標としての有用性を検証した。また、以前の検討で偽陰性を示した膀胱発がん物質 4 種について、投与条件を変更した再検討を実施した。

## B．研究方法

国立衛研担当分の新規化学物質として、膀胱発がん物質 3 種：2-Nitrosotoluene (2-NT), *m*-Cresidine (*m*-Cre), Sulfasalazine (SSZ)、膀胱発がんプロモーター物質：Sodium L-ascorbate (Na-AsA) および非膀胱発がん物質：2-Nitropropane (2-NP) を、6 週齢の雄 F344 ラットに 28 日間経口投与した。各物質の投与濃度/経路は、報告されている発がん性試験の方法に基づき、0.338% 2-NT 混餌、160 mg/kg/day *m*-Cre 強制経口（溶媒：コーン油）675 mg/kg/day SSZ 強制経口、5% Na-AsA 混餌、40 mg/kg/day 2-NP 強制経口投与に設定した。

偽陰性物質の再検討として、Dimethylarsinic acid (DMA), 4-Amino-2-nitrophenol (ANP), ニトリロ三酢

酸三ナトリウム一水和物(NTA), *N*-Nitrosomorpholine (NMOR) を 1 週（0.02% DMA 飲水、2% NTA 混餌）または 4 週間（0.015% DMA 飲水、0.5% ANP 混餌、0.0125% NMOR 飲水、2% NTA 混餌）経口投与した。NTA の 4 週投与群には、同物質による膀胱発がん感受性が高い雌 F344 ラットを用いた。

膀胱の採材方法は、先行研究班で作成した多施設での共通臓器処理マニュアルに従った。膀胱のホルマリン固定パラフィン包埋標本を作製し、免疫組織化学的手法により -H2AX 形成/Ki67 発現解析を実施した。膀胱粘膜における -H2AX および Ki67 陽性細胞をカウントし、陽性率を対照群と比較した。

（倫理面への配慮）

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

## C．研究結果

膀胱上皮細胞における -H2AX 形成および Ki67 発現を免疫組織化学的に検索した。2000 個以上/匹の粘膜上皮細胞をカウントし、1000 個あたりの -H2AX 陽性細胞数を算出した。その結果、新規物質のうち 2-NT 投与群において、対照群と比較して -H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた（図 1）。

細胞増殖マーカーである Ki67 についても、-H2AX と同様の方法で検索を行った。その結果、Na-AsA 投与群において、陽性細胞の割合が有意に増加した（図 2）。

再検討物質を投与したラットの膀胱を用いて、同様に -H2AX 陽性細胞をカウントした結果、NTA を 1 週間投与した雄および 4 週投与後の雌において、有意な増

加が認められた（図 3）。0.5% ANP および 0.015% DMA の 4 週投与群においても増加傾向がみられたものの、統計学的有意差は認められなかった。

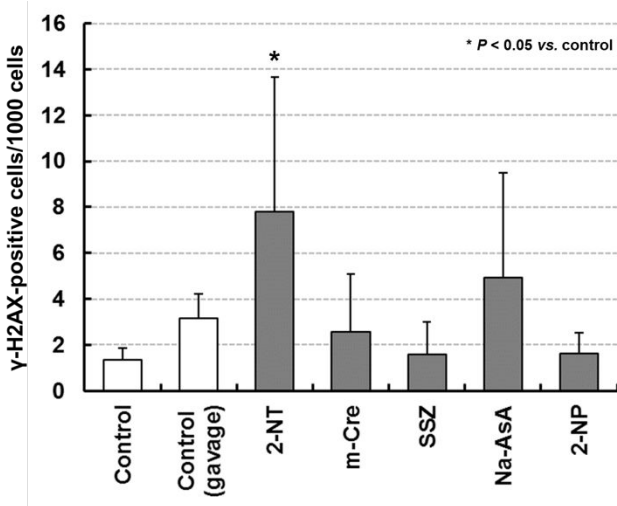


図 1. ラット膀胱粘膜上皮細胞における γ-H2AX 陽性細胞の定量解析（新規物質）。（統計：Student *t*-test）

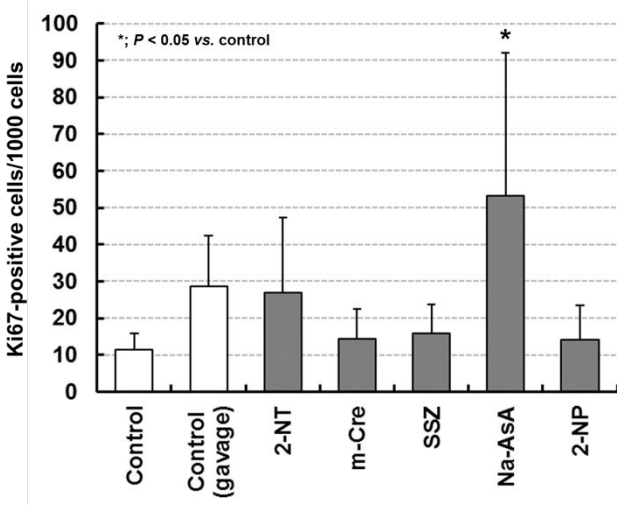


図 2. ラット膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析（新規物質）。（統計：Student *t*-test）

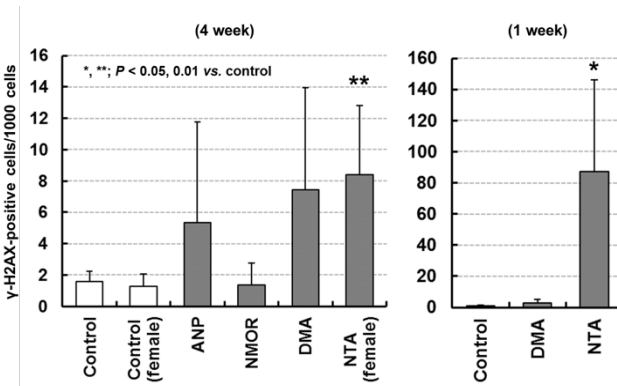


図 3. ラット膀胱粘膜上皮細胞における γ-H2AX 陽性細胞の定量解析（再検討物質）。（統計：Student *t*-test）

OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME

Standard Project Submission Form

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

---

**PROJECT TITLE**

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

**SUBMITTED BY (Country / European Commission / Secretariat)**

Japan

**DATE OF SUBMISSION TO THE SECRETARIAT**

31 October 2018

---

**DETAILS OF LEAD COUNTRY/CONSORTIUM**

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

図 4. 既存の OECD テストガイドライン（TG 407）に、γ-H2AX 免疫染色による膀胱発がん性早期検出法の追加を提案する SPSF（表紙）。（厚生労働省を通じて提出）

#### D. 考察

今年度新たに検討した 3 種の膀胱発がん物質のうち、2-NT 投与群の膀胱には、γ-H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、膀胱発がんプロモーター物質である Na-AsA 投与群では、γ-H2AX 形成の増加傾向および Ki67 発現の有意な増加がみられた。膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質である 2-NP は、γ-H2AX/Ki67 いずれの増加も誘導しなかった。

再検討を実施した膀胱発がん物質 4 種のうち、NTA は雄の 1 週投与群および雌の 4 週投与群において、γ-H2AX 形成の有意な増加を示した。NTA の 2%混餌投与によるラット 2 年間発がん性試験において、膀胱腫瘍発生率は雄で 4%（1/24）雌で 21%（5/24）と、雌の方が感受性が高いことが報告されている（National Toxicology Program, 1977）。γ-H2AX による膀胱発がん性の検出は、発がん感受性の雌雄差を反映し得ることが示唆された。

当研究班においてこれまでに蓄積されたデータを総合すると、γ-H2AX 免疫染色によって化学物質のラット膀胱に対する発がん性を、感度 84.4%（27/32）および特異度 100%（22/22）と、高い精度で予測できることが示された。以上の結果を受けて、「膀胱における γ-H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与毒性試験に対する

既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に追加する改定案 (Standard Project Submission Form; SPSF) を厚生労働省を通じて提出した (図 4)。

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

## E. 結論

本研究の結果から、-H2AX 免疫染色は、化学物質の膀胱発がん性早期検出マーカーとして応用できることが示された。平成 31 年度は、提出したガイドライン改定案について、OECD ワーキンググループ (Working Group of the National Coordinators for the Test Guidelines Programme; WNT) からの指摘に対して必要な対応を実施する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with *o*-toluidine and *o*-anisidine. Arch Toxicol. 2019; 93: 753-62.
- 2) Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of acetaminophen using an obese rat model. J Toxicol Sci. 2018; 43: 423-33.
- 3) Toyoda T, Cho YM, Matsushita K, Tachibana S, Senuma M, Akagi J, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of hexyl acetate in SD rats. J Toxicol Pathol. In press.
- 4) Sone M, Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Morikawa T, Nishikawa A, Ogawa K. Immunohistochemistry of -H2AX as a method of early detection of urinary bladder carcinogenicity in mice. J Appl Toxicol. In press.
- 5) Yang Q, Yasuda T, Choi E, Toyoda T, Roland JT, Uchida E, Yoshida H, Seto Y, Goldenring JR, Nomura S. MEK inhibitor reverses metaplasia and allows re-emergence of normal lineages in *Helicobacter pylori*-infected gerbils. Gastroenterology. 2019; 156: 577-81.
- 6) Hirata T, Cho YM, Suzuki I, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC) induced apoptotic cell death and G2/M cell cycle

arrest via ROS production in human esophageal epithelial cancer cells. J Toxicol Sci. 2019; 44: 73-81.

- 7) Funahashi S, Okazaki Y, Nagai H, Chew SH, Ogawa K, Toyoda T, Cho YM, Toyokuni S. Twist1 was detected in mesenchymal cells of mammary fibroadenoma and invasive components of breast carcinoma in rats. J Toxicol Pathol. 2019; 32: 19-26.
- 8) Tanoue Y, Toyoda T, Sun J, Mustofa MK, Tateishi C, Endo S, Motoyama N, Araki K, Wu D, Okuno Y, Tsukamoto T, Takeya M, Ihn H, Vaziri C, Tateishi S. Differential roles of Rad18 and Chk2 in genome maintenance and skin carcinogenesis following UV exposure. J Invest Dermatol. 2018; 138: 2550-7.
- 9) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Takahashi M, Inoue K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-ethylbutanal in F344 rats. Regul Toxicol Pharmacol. 2018; 100: 118-26.
- 10) Akagi J, Cho YM, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Subchronic toxicity evaluation of 5-hexenyl isothiocyanate, a nature identical flavoring substance from *Wasabia japonica*, in F344/DuCrj rats. Food Chem Toxicol. 2018; 122: 80-6.
- 11) Furihata C, Toyoda T, Ogawa K, Suzuki T. Using RNA-Seq with 11 marker genes to evaluate 1,4-dioxane compared with typical genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens. Mutat Res. 2018; 834: 51-5.

### 2. 学会発表

- 1) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、中村義一、齋島由二 RNA アプタマーを利用した機能性医療材料開発 . 日本薬学会第 139 年会、千葉 (2019 年 3 月)
- 2) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Effects of N-acetyl-L-cysteine on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore (2019.3)
- 3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子 . 膀胱発がん物質投与初期における遺伝子発現解析および新規膀胱発がんマーカーの探索 . 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 2 月)
- 4) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子 . 1,3-Dichloro-2-propanol の F344 ラットを用いた 28 日間反復強制経口投与による毒性プロファイルの検索 . 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 2 月)
- 5) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子 . 膀胱発がん物質投与による -H2AX 形成の用量相関性及び経時的変化 . 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 2 月)
- 6) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子 . C57BL/6J 野生型および

PoI 欠損マウスにおけるベンゾ[a]ピレンおよび  
-ナフトフラボン併用投与の効果 . 第 35 回日本毒性  
病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 1 月)

7) 曹永晩、水田保子、赤木純一、豊田武士、井手鉄  
哉、小川久美子 . 腹腔内投与銀ナノ粒子による BALB/c  
マウスの急性毒性における抗酸化剤の影響 . 第 35 回  
日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年  
1 月)

8) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T,  
Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K,  
Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Metabolomics  
and DNA adductome analysis of urinary bladder  
carcinogen *o*-toluidine. The 23rd Shizuoka Forum  
on Health and Longevity, Shizuoka (2018.11)

9) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T,  
Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K,  
Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Metabolomics  
and DNA adductome analysis of urinary bladder  
carcinogen *o*-toluidine. The 4th International  
Conference on Pharma-food General Information,  
Shizuoka (2018.11)

10) Akagi J, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Yokoi M,  
Hanaoka F, Ohmori H, Ogawa K.  
Benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis in  
PoI -knockout mice. 3R&3C Symposium, Kanazawa  
(2018.11)

11) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福  
井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、中村義一、  
齋島由二 . RNA アプタマーを用いた新規骨再生用材料  
の *in vivo* 性能評価 . 第 40 回日本バイオマテリアル  
学会大会、神戸 (2018 年 11 月)

12) 野村幸世、豊田武士、菅原寧彦 . 胃癌バイオマ  
ーカーとしての血清 TFF3 の起源とその上昇機序の解  
明 . 第 22 回日本肝臓学会大会、神戸 (2018 年 11 月)

13) 田島悠也、豊田武士、平山裕一郎、橋詰力、松  
下幸平、小川久美子、渡辺賢二、戸塚ゆ加里、若林  
敬二、三好規之 . 膀胱発がん性芳香族アミン  
*o*-toluidine の代謝物分析と DNA 付加体 . 日本環境変  
異原学会第 47 回大会、京都 (2018 年 11 月)

14) 降旗千恵、豊田武士、小川久美子、鈴木孝昌 .  
RNA-Seq による 1,4-ジオキサン (D0) のラット肝臓  
における遺伝子発現プロファイル : 遺伝毒性および  
非遺伝毒性肝発がん物質との比較 . 日本環境変異原  
学会第 47 回大会、京都 (2018 年 11 月)

15) 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)

16) 山田貴宣、豊田武士、小川久美子 . 幹細胞マ  
ーカー免疫染色による膀胱発がん物質の早期検出 . 第  
77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)

17) 保田智彦、吉田寛、内田英二、豊田武士、瀬戸  
泰之、野村幸世 . MEK 阻害剤によるヘリコバクター・  
ピロリ菌感染スナネズミ胃粘膜の回復 . 第 77 回日本  
癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)

18) 保田智彦、Qing Yang、豊田武士、Eunyoung Choi、

内田英二、吉田寛、瀬戸泰之、James R. Goldenring、  
野村幸世 . MEK 阻害剤 Selumetinib による *H. pylori*  
感染スナネズミ胃粘膜における化生粘膜の回復 . 第  
27 回消化器疾患病態治療研究会、高知 (2018 年 9 月)

19) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Tamehiro  
N, Kimura Y, Adachi R, Ogawa K. Dose-dependent  
sensitization effects of transcutaneously  
exposed acid-hydrolyzed wheat protein. 16th  
European Congress of Toxicologic Pathology,  
Brussels (2018.9)

20) 豊田武士、山田貴宣、鈴木周五、松下幸平、曹  
永晩、赤木純一、森川朋美、水田保子、西川秋佳、  
小川久美子 . -H2AX を指標とした化学物質の膀胱発  
がん性早期検出系の開発 . 第 33 回発癌病理研究会、  
御殿場 (2018 年 8 月)

21) 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、  
松下幸平、小川久美子、若林敬二 . 芳香族アミン類  
の代謝物分析と DNA 付加体 . 第 33 回発癌病理研究会、  
御殿場 (2018 年 8 月)

22) 豊田武士、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、小  
川久美子 . 膀胱発がん性芳香族アミンの短期投与に  
よるラット膀胱粘膜遺伝子発現動態への影響 . 第 45  
回日本毒性学会学術年会、大阪 (2018 年 7 月)

23) 曹永晩、赤木純一、水田保子、豊田武士、小川  
久美子 . コレラトキシン及びコレラトキシン B サブ  
ユニットの経皮曝露感作性試験におけるアジュバン  
トとしての可能性 . 第 45 回日本毒性学会学術年会、  
大阪 (2018 年 7 月)

24) 山田貴宣、豊田武士、曾根瑞季、鈴木周五、松  
下幸平、森川朋美、小川久美子 . -H2AX を指標とし  
た膀胱発がん性の早期予測 - 追加の化学物質による  
検証 - . 第 45 回日本毒性学会学術年会、大阪 (2018  
年 7 月)

25) 豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、森川朋美、  
山田貴宣、三好規之、若林敬二、小川久美子 . 膀胱  
がんリスク因子としてのノルハルマン代謝物 : ラッ  
トを用いた検討 . がん予防学術大会 2018 高松、高松  
(2018 年 6 月)

26) Nomura S, Yasuda T, Yang Q, Toyoda T, Choi E,  
Uchida E, Seto Y, Goldenring JR. Amelioration of  
metaplasia and re-emergence of normal gastric  
lineages after treatment of *H. pylori* infected  
gerbils with a MEK inhibitor. Digestive Disease  
Week 2018, Washington (2018.6)

27) 森川朋美、松下幸平、豊田武士、山田貴宣、高  
橋美和、井上薫、小川久美子 . ラットを用いた 2-エ  
チルブタナールの 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試  
験 . 日本食品化学学会第 24 回総会・学術大会、東京  
(2018 年 5 月)

28) 野村幸世、豊田武士、大津洋、石橋祐子、愛甲  
丞、長田梨比人、市田晃彦、菅原寧彦、國土典弘、  
瀬戸泰之 . 胃癌、膵癌、乳癌早期発見バイオマ  
ーカーとしての血清 TFF3 とその起源の解明 . 第 118 回日  
本外科学会定期学術集会、東京 (2018 年 4 月)

## G. 知的所有権の取得状況



**1. 特許取得**

該当なし

**2. 実用新案登録**

該当なし

**3. その他**

該当なし

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

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）  
分担研究項目：病理組織発がんマーカーを用いた中期発がんリスク評価法の確立：膀胱発がん物質の評価

研究分担者 鈴木 周五 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 講師

## 研究要旨

本研究は、膀胱を標的とする発がん物質を早期に検出できる指標の探索を目的としている。現在まで DNA 二重鎖切断マーカーである H2AX が、遺伝毒性の有無に関わらず膀胱発がん物質の早期検出指標として利用し得る可能性を示した。平成 30 年度は H2AX に関して、膀胱発がん物質のみならず、単独では発がん性を示さない発がん促進物質での検討とともに、発がん物質ながら膀胱に発がん性を示さない物質を用いて、感受性や特異性についても検討した。結果、膀胱発がん物質のみならず発がん促進物質でも H2AX の有意な上昇を認め、この試験法の感受性が高いことを示した。一方で、膀胱に発がん性を示さない発がん物質では H2AX 標識率が対照群と差がなく、検出法の膀胱発がん物質への特異性についても示された。以上の結果から、化審法で実施される 28 日間反復投与試験のプロトコールに基づいて採取した膀胱において、遺伝毒性の有無に関わらず膀胱への発がん性を示す物質を検出でき、膀胱発がん促進物質についても検出できる可能性を示せた。

## A . 研究目的

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

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

平成 30 年度は、この検出法の検出精度を詳細に検討する目的で、遺伝毒性・非遺伝毒性膀胱発がん物質での検討とともに、単独では発がん性を示さない発がん促進物質や、他臓器では発がん性を示すものの膀胱には発がん性を認めない化学物質を用いて特異性についても検討した。

## B . 研究方法

6 週齢 F344 雄ラットに、0.028% N-Butyl-N-(3-carboxypropyl)nitrosamine (BCPN)、0.005% 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO) を飲水投与、0.75% 1-Naphthyl-N-methyl carbamate (Carbaryl)、0.3% Tributyl phosphate (TBP)、5% Saccharin sodium salt dihydrate (Na-Sac) を混餌投与し、4 週間後に屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。肝臓を分担研究者に要望された状態（凍結）で送付した。また、6 週齢 F344 雄ラットに、膀胱発がん促進物質である 0.0114%

nicotine hydrogen tartrate (0.004% nicotine 換算; nicotine) を飲水投与し、4 週間後に屠殺・剖検し、膀胱を採取した。全ての膀胱組織について免疫組織染色を行い、 $\gamma$ H2AX および Ki67 の標識率を検討した。

（倫理面への配慮）

倫理面の配慮については、名古屋市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

## C . 研究結果

試験開始 1 週間後に 0.005% 4NQO 投与群が体重減少を来したため、2 週目以降は 0.0025% に濃度変更を行った。試験期間中、Carbaryl および 4NQO 投与群において対照群に比べ、体重増加抑制傾向を認め、屠殺・剖検時の体重は、上記 Carbaryl、4NQO および TBP 投与群で有意に抑制された。Nicotine についても試験期間中に体重抑制傾向および、屠殺・剖検時体重の有意な抑制を認めた。

膀胱組織学的検討の結果、BCPN および nicotine 投与群全てに simple hyperplasia を認め、TBP 投与群全てに papillary/nodular (PN) hyperplasia を認めた。

膀胱粘膜上皮における  $\gamma$ H2AX 標識率は、BCPN、Carbaryl および TBP 投与群で強い上昇を認め、多群間比較検定でも有意な上昇を示した。一方、各化学物質と対照群との一対一での比較を行った結果、上記の BCPN、Carbaryl および TBP とともに Na-Sac においても標識率の有意な上昇を認めた。一方で 4NQO では対照群と差がなかった (図 1)。Nicotine 投与群においても対照群と比較し有意な上昇を認めた (nicotine, control:  $2.8 \pm 0.3$ ,  $0.8 \pm 0.1\%$ , respectively;  $P < 0.001$ )。

膀胱粘膜上皮における Ki67 標識率は、BCPN、Carbaryl および TBP 投与群で上昇を認め、多群間比較検定でも有意な上昇を示した。一方、各化学物質と対照群との一対

一での比較を行った結果、上記のBCPN、CarbarylおよびTBPとともにNa-Sacにおいても標識率の有意な上昇を認めた。一方で4NQOでは対照群と差がなかった(図2)。Nicotine投与群においても対照群と比較し有意な上昇を認めた(nicotine, control:  $8.4 \pm 3.4$ ,  $3.2 \pm 1.4\%$ , respectively;  $P < 0.001$ )。

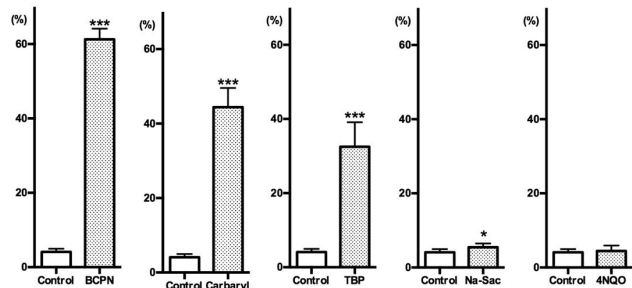


図1. 膀胱粘膜上皮細胞における H2AX陽性細胞の定量解析

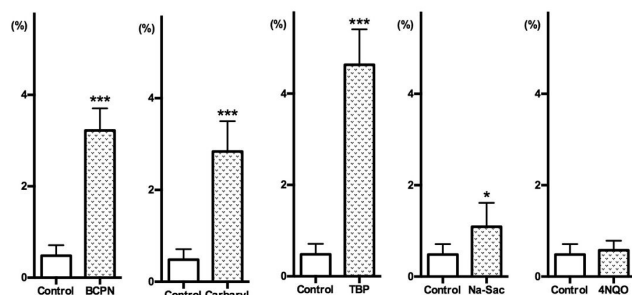


図2. 膀胱粘膜上皮細胞におけるKi67陽性細胞の定量解析

#### D. 考察

化審法で実施される28日間反復投与試験においては、各化学物質を対照群と比較検討すると考えるため、今回の膀胱発がん物質検出法を検討するにあたり、各化学物質と対照群との一対一での比較が重要と考えている。その結果、 $\gamma$ H2AXは膀胱発がん物質のみならず、発がん促進物質であるNa-Sacやnicotineにおいても検出可能だった。また、この結果はKi67でも同様に得られた。一方で、発がん物質ながら膀胱への標的性のない4NQOは $\gamma$ H2AXおよびKi67の標識率はいずれも対照群と差がなく、これら指標の上昇には臓器特異性が関与することが示された。

#### E. 結論

化審法で実施される28日間反復投与試験において抽出した膀胱を用いた H2AX免疫染色による標識率の検討は、膀胱に特異的な発がん物質の検出法として有用であることを示した。また、膀胱発がん促進物質も検出できる可能性を示せた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ito, Y., Naiki-Ito, A., Kato, H., Suzuki, S., Kuno, T., Ishiguro, Y., Takahashi, S., Uemura,

H.: Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by down-regulation of androgen receptor. *Oncotarget* (2018) 9:13859-13869.

- 2) Suzuki, S., Cohen, S.M., Arnold, L.L., Kato, H., Fuji, S., Pennington, K.L., Nagayasu, Y., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., Takahashi, S.: Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis. *Toxicology* (2018) 398-399:31-40.
- 3) Naiki, T., Naiki-Ito, A., Iida, K., Etani, T., Kato, H., Suzuki, S., Yamashita, Y., Kawai, N., Yasui, T., Takahashi, S.: GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis. *Oncotarget* (2018) 9:15847-15859.
- 4) Hayashi, Y., Nishiyama, T., Nakatochi, M., Suzuki, S., Takahashi, S., Sugiura-Ogasawara, M.: Association of genetic variants of PD1 with recurrent pregnancy loss. *Reprod Med Biol* (2018) 17:195-202.
- 5) Takeshita, S., Yamashita, Y., Shiomi, K., Suzuki, N., Yoshida, J., Naiki-Ito, A., Suzuki, S., Akatsuka, S., Toyokuni, S., Takahashi, T., Mase, S., Arakawa, A., Sugiura-Ogasawara, M., Takahashi, S. Expression of P-REX2a is associated with poor prognosis in endometrial malignancies. *Oncotarget* (2018) 9:24778-24786.
- 6) Suzuki, S., Kato, H., Fuji, S., Naiki, T., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., Takahashi, S.: Early detection of prostate carcinogenesis by immunohistochemistry of HMGB2. *J Toxicol Sci* (2018) 43:359-367.
- 7) Kuno, T., Kato, H., Naiki-Ito, A., Suzuki, S., Tanaka, T., Takahashi, S., Mori, H.: Preventive effects of fermented brown rice and rice bran on spontaneous lymphomagenesis in AKR/NS1c female mice. *Asian Pac J Cancer Prev* (2018) 19:3217-3223.
- 8) Mapoung, S., Suzuki, S., Fuji, S., Naiki-Ito, A., Kato, H., Yodkeeree, S., Ovatlarnporn, C., Takahashi, S., Limtrakul, P.: Cyclohexanone curcumin analogs inhibit the progression of castration resistance prostate cancer in vitro and in vivo. *Cancer Sci* (2019) 110:596-607.

##### 2. 学会発表

- 1) 鈴木周五、他、ラット膀胱発がんに対するニコチンの影響、第107回日本病理学会総会、2017年6月、札幌。
- 2) 鈴木周五、他、ラット膀胱発がんに対するニコチンの影響、第77回日本癌学会学術総会、2017年9月、大阪。

- 3) 鈴木周五、他、ラット膀胱癌に対するニコチンの影響、第 35 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2019 年 1 月、東京.

**G. 知的財産権の出願・登録状況**  
(予定を含む。)

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

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

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）  
分担研究項目：遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 准教授

## 研究要旨

本研究は化学物質の有害性評価の迅速化・高精度化・標準化を可能とする評価モデルの構築を目的とし、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立および検証を行った。本年度に遺伝毒性ラット肝発がん物質 4 種類及びそれ以外の物質 6 種類（非遺伝毒性ラット肝発がん物質 5 種類と遺伝毒性非発がん物質 1 種類）をラットに単回投与し、投与 24 時間後の肝臓におけるマーカー遺伝子（10 遺伝子）の発現データを qPCR で取得し、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いて肝発がん性を予測した。その結果、「陽性」と判定されたものは 1 物質であり、それは遺伝毒性肝発がん物質であった。また、それ以外の物質はすべて「陰性」と判定された。以上の結果から、本肝発がん性予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を高い特異度で検出できる可能性が示唆された。

## A．研究目的

生活環境を取り巻く化学物質の発がん性を迅速にかつ高精度に検証できるシステムの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、このシステムで得られた結果は国民生活の安全・安心を保証する重要な基盤となる。本研究では化学物質の発がん性評価の迅速化・高精度化・標準化を目的に、平成23年度～28年度「化学物質の安全性と発がん性リスク評価としての短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究」（吉見班）で蓄積してきた病理組織発がんマーカー及び試験法をより一層発展・高精度化し、高精度発がん評価モデルとして確立する。さらに国際的に認知させる必要があるため、それらの発がん性評価法のOECDテストガイドライン化を目指すことが重要である。そこで、本申請研究においては、OECDテストガイドライン化の成立を最終目的として、6研究施設による協同体制にて下記に記す三つの研究を実施する。第一に、膀胱を標的とする発がん物質を用いた28日間反復投与試験及び大腸を標的とする発がん物質を用いた90日間反復投与試験を実施し、病理組織発がんマーカーを用いた大腸及び膀胱発がんリスク評価法を確立する。第二に、これまで開発した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性をより一層検証し、確立する。第三に、上記の試料を用いてDNA付加体を網羅的に解析しカタログ化する方法（アダクトーム解析）による化学物質のDNA損傷を指標とした遺伝毒性評価法を開発する。

本研究の意義は、成果となる発がん性評価法及びガイドラインが、化学物質の有害性評価において汎用的に用いられかつ厚生労働行政施策の科学的基盤となることであり、得られた発がん性に関する情報は厚生労働行政施策への活用が非常に期待できる。また、得られる成果は国内のみならず、化学物質の安全性評価に係る国際的な試験法やガイドライン等への活用

も期待される。

平成 30 年度は、我々が構築した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルを確立するために、4 種類の遺伝毒性ラット肝発がん物質及び 6 種類のそれ以外の物質（非遺伝毒性ラット肝発がん物質 5 種類と遺伝毒性非発がん物質 1 種類）遺伝毒性ラット肝発がん物質について、ラット単回投与と試験を行い、得られた遺伝子発現データを予測モデルに入力し、判定を行った。

## B．研究方法

遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質 10 種類について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。実験動物は 6 週齢の雄 SD ラットを用いた。動物試験プロトコールは事前に共有・配布し、プロトコールに従い試験を実施した。被験物質と投与濃度は（各物質の LD50 の 1/3）表 1 の通りである。

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

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

と Super Script VI VIL0 Maste Mix(invitrogen) のキットを使用した。

得られた遺伝子発現データを我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル ( サポートベクターマシンによる数理学的アルゴリズムによるモデル ) に入力し、陽性または陰性の判定を行った。

(倫理面への配慮)

大阪市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

### C . 研究結果

qPCR で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った (表 1)。本モデルでは、遺伝毒性ラット肝発がん物質を「陽性」、その他の物質 (非遺伝毒性ラット肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質) を「陰性」と判定する。その結果、「陽性」と判定されたものは 1 物質であり、それは遺伝毒性肝発がん物質であった。また、それ以外の物質はすべて「陰性」と判定された。

表 1 遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた判定結果

	被検物質	投与量 (mg/kg)	判定結果
Ames(+) 肝発がん性(+)	2-Nitropropane (2-NP) (陽性対照物質)	240	Positive
	Vinyl bromide (VB)	170	Negative
	Dichloroacetic acid (DCA)	940	Negative
	Hydrazine sulfate (HS)	200	Negative
	Acid Red 26 (AR-26)	2000	Positive
Ames(-) 肝発がん性(+)	Hexachlorobenzene (HCB)	2000	Negative
	Carbon tetrachloride (CCL4)	780	Negative
	Gemfibrozil (GFZ)	470	Negative
	Ethinylestradiol (EE)	320	Negative
	Coumarin	100	Negative
Ames(+) 発がん性(-)	Isoniazid (INH)	420	Negative

### D . 考察

非遺伝毒性ラット肝発がん物質及び遺伝毒性非発がん物質の合計 6 物質はすべて陰性と判定されたことから、本モデルは遺伝毒性肝発がん物質を高い特異度で検出できる可能性が示唆された。一方で、遺伝毒性肝発がん物質 4 物質のうち、3 物質が偽陰性となった。今後、検出精度を上げるには偽陰性物質について最大耐量を用いて再評価する必要があると考えられる。

### E . 結論

我々が構築した遺伝子セットを用いた肝発がん性予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を高い特異度で検出できる可能性が示唆された。今後も本試験系の検出限界や改良についての検証を引き続き行う必要がある。

### F . 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, Wanibuchi H. Acetoaceto-o-toluidide enhances cellular

proliferative activity in the urinary bladder of rats. Toxicol Sci. 2019, in press.

- 2) Okuno T, Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. mTOR Activation in Liver Tumors Is Associated with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Both Mouse Models and Humans. Cancers (Basel). 2018; 10: 465.
- 3) Gi M, Fujioka M, Yamano S, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Yamaguchi T, Tago Y, Kitano M, Hayashi SM, Wanibuchi H. Chronic dietary toxicity and carcinogenicity studies of dammar resin in F344 rats. Arch Toxicol. 2018; 92: 3565-83.
- 4) Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. In vivo positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats. Arch Toxicol. 2018; 92: 3207-21.
- 5) Fukushima S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Matsumoto M. Quantitative Approaches to Assess Key Carcinogenic Events of Genotoxic Carcinogens. Toxicol Res. 2018; 34: 291-6.
- 6) Shimizu Y, Tamada S, Kato M, Takeyama Y, Fujioka M, Kakehashi A, Nakatani T, Wanibuchi H, Gi M. Steroid sulfatase promotes invasion through epithelial-mesenchymal transition and predicts the progression of bladder cancer. Exp Ther Med. 2018; 16: 4463-70.

#### 2. 学会発表

- 1) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、鰐淵英機 . 職業性胆管がんにおける疫学のおよび動物モデルでの知見 . 第 25 回日本がん予防学会学術総会、香川 (2018 年 6 月)
- 2) 魏民、藤岡正喜、奥野高裕、行松直、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機 . ラットにおける 1,4-dioxane の変異原性と発がん性の定量的解析 . 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 3) 魏民、藤岡正喜、行松直、奥野高裕、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機 . BBN 誘発マウス膀胱がんモデルにおける Acetazolamide の予防効果の検討 . 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 2 月)

### G. 知的所有権の取得状況

#### 1 . 特許取得

該当なし

#### 2 . 実用新案登録

該当なし

#### 3 . その他

該当なし

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

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）  
分担研究項目：遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立

研究分担者 横平 政直 香川大学医学部 腫瘍病理学 准教授

## 研究要旨

平成 30 年度は、遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVM モデル）の検出力を検証するため、7 種の遺伝毒性肝発がん物質、3 種の非肝発がん物質、及び 1 種類の非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、24 時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。その結果、「Positive」と判定されたものはすべて遺伝毒性発がん物質（4 物質）であった。また、非肝発がん物質の 4 物質はすべて「Negative」と判定された。一方で、遺伝毒性肝発がん物質のうち、2 物質が偽陰性となった。これらの物質のうち 1 つは肝発がん性がないという文献も見られるが、今後も調査・検討が必要である。

## A. 研究目的

生活環境を取り巻く化学物質の発がん性を迅速にかつ高精度に検証できるシステムの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、システムで得られた結果は国民生活の安全・安心を保障する。本研究では化学物質の発がん性評価の迅速化・高度化・標準化を目的に、平成23年度～28年度「化学物質の安全性と発がん性リスク評価としての短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究」（吉見班）で蓄積してきた病理組織発がんマーカーおよび試験法をより一層精度化し、確立する必要がある。6研究施設による協同体制にて多数の化学物質を同時に評価することにより、評価法の標準化を推進し、国際動向を見据えたOECDテストガイドライン化を実現する。

当施設ではこれまで開発した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性をより一層検証し、確立する。本研究の特色は化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に予測できる評価法及びヒトへの外挿に必要な発がんメカニズムに関する情報が得られる試験系を確立することにある。

平成29年度は、TGP由来ラット肝臓遺伝子発現データをもとに構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力を検証するため、4種の遺伝毒性肝発がん物質及び7種類の非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、24時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。その結果、遺伝子セットを用いた判定方法により、遺伝毒性発がん物質が正確に判定されており、この方法は遺伝毒性発がん物質の検出に有用性が確認された。

平成30年度は、引き続き、遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力を検証するため、7種の遺伝毒性肝発がん物質、3種の非肝発がん物質、及び1種類の非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、24時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。

## B. 研究方法

平成 30 年度では、遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の発がん物質について、ラット単回投与試験（剖検は投与 24 時間後）を行い、得られた肝組織から遺伝

子発現データを取得した。動物試験は 3 施設（担当：鰐淵/魏、塚本、横平）で行われたが、当施設では被験物質として、7 種の遺伝毒性肝発がん物質、3 種の非肝発がん物質、及び 1 種類の非遺伝毒性非発がん物質について検討した（表 1）。動物試験プロトコルは事前に共有・配布し、プロトコルに従い試験を実施した。遺伝子発現については、リアルタイム PCR でのデータを取得した。

日本チャールズリバー社（神奈川県厚木）より購入した 4 週齢の SD ラット（雄性）について、2 週間の馴化期間の後に実験を開始した。群構成を表 2 に示す。馴化期間に体重測定を行い、各群の平均体重にばらつきがないよう群分けを行った。実験開始時に、体重測定を行いながら体重当たりの投与量に調整した被験物質を各動物に強制胃内投与した。被験物質の投与濃度は表 3 の通りである。被験物質投与後 24 時間後に剖検を行った。剖検は、イソフルラン（abbvie #B506）吸入麻酔後、腹部大動脈から自然放血により安楽死させた。安楽死後、開腹し、臓器に肉眼的異常の有無を観察した。肝臓を摘出し、RNA 抽出用として、外側左葉（LL）を摘出後、下端辺縁部を約 2cm×0.5cm の大きさで 2 スライス切り出した。それぞれ 1mL の RNA later が入った 1.5mL チューブへ移した（合計 2 本、そのうち 1 本は、他施設でのバリデーション用）、1.5mL チューブを 4 で一晩保管後、-80℃へ長期保管した。

凍結保存サンプル用として、RNA 抽出用に採材した後の残りの外側左葉の上半分を 1.5ml チューブ 2 本分採取し、液体窒素により凍結後、ディープフリーザーにて凍結保管した（一本は DNA adduct 解析用）。ホルマリン固定用サンプルは、外側左葉の下半分、内側右葉（RM）および右葉尾部（R2）から計 3 スライス切り出し、カセットにおいて 10%ホルマリンにて固定した。

リアルタイム RT-PCR については施設共通のプロトコルを基に行った。具体的には、肝臓からの total RNA 抽出は RNeasy mini kit（キアゲン）を使用し、3mm×3mm 程度の肝組織片から total RNA を抽出した。30μL の RNase free H<sub>2</sub>O で溶出した。cDNA の合成は Super



Script IV VIL0 Maste Mix(invitrogen) のキットを使用し、total RNA 1000 ng とした。逆転写反応は、total 20 $\mu$ L の volume で行った。サーマルサイクラーによる反応は、25 :10min、50 :10min、85 :5min、4 : とした。

QPCR 用サンプルは「RT 反応液(20 $\mu$ l)+ MilliQ 80 $\mu$ l = 100 $\mu$ l」で調整した。TaqMan Fast Universal PCR Master Mixes (サーモフィッシャー) を使用し、リアルタイム PCR 反応をおこなった。用いたプライマーは表 4 の通りである。

#### (倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

2 群において検討予定であった物質の Vinyl chloride であるが、予定していた高濃度の試薬を入手することが困難であり、この群は実験から削除した。

実験中、全群とも外見に異常を認めなかったが、被験物質投与後 24 時間後に 1 群 (2-Nitrosopropane 群) の 1 匹の死亡が確認された。

肝臓の病理組織所見では、1 群 (2-Nitrosopropane 群) はうっ血、門脈域を中心とする炎症細胞浸潤 (多形核白血球、リンパ球) を認めた。その他の群では、陰性対照群とくらべて、わずかな炎症細胞浸潤～変化は乏しい印象であった。

リアルタイム RT-PCR の結果を表 5 に示す。この結果を代表研究者に送り、遺伝子発現データを構築済の肝発がん性予測モデル (サポートベクターマシーンによる数理的アルゴリズムによるモデル) に入力し、肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った。その結果、2-Nitrosopropane (1 群)、4,4'-Methylene (4 群)、Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate (6 群)、Retrorsine (7 群) が「Positive」と判定された。その他の、4,4'-Oxydianiline (3 群)、2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene) (5 群)、Butylated hydroxyanisole (BHA) (8 群)、Methimazole (MTZ) (9 群)、Sulfasalazine (SS) (10 群)、Allyl alcohol (AA) (11 群) はいずれも「Negative」と判定された。

### D. 考察

今回の検討により、肝臓をターゲットとしない発がん物質や非遺伝毒性非発がん物の合計 4 物質はすべて陰性と判定された。一方で、遺伝毒性肝発がん物質の 6 物質 (陽性対照を除く) のうち、2 物質は陰性と判定され、偽陰性となった。これらの 2 物質は Ames 試験陽性であるが、*in vivo* における肝発がん性についての文献報告を調査した。2,4-Dinitrotoluene については、Ames 試験は陽性であるものの、*in vivo* における肝

発がん性は乏しいという報告があった (Leonard TB. et al., 1987)。この報告は本試験系での陰性の理由を支持するものである。一方で、4,4'-Oxydianiline については、ラットにおける明らかな肝発がんが報告されている (Maronpot RR. et al., 1989)。この物質が本試験系で陰性となった要因については今後も引き続き調査・検討が必要である。

今回の実験から、本試験系において少なくとも「Positive」と判定された物質は遺伝毒性肝発癌物質であると言えることが濃厚となった。一方で、非発癌物質を高精度で「Negative」と判定できるような試験系の考慮も必要と考えられる。この研究全体 (多施設共同研究) としては、多数の物質についての検証を行うが、それぞれの非発癌物質について、10 の遺伝子マーカーの 1 つずつの発現状況を見直す必要があると考えられる。すなわち、今回の一連の実験結果を踏まえて、本試験系を「Positive」判定を目的としたものと「Negative」判定を目的としたものの 2 つに分ける必要があるかもしれないと考える (2 つの試験系は採用する遺伝子セットが異なる)。

### E. 結論

今回、遺伝子セットを用いた判定方法により、「Positive」と判定されたものはすべて遺伝毒性発がん物質 (4 物質) であった。また、非肝発癌物質の 4 物質はすべて「Negative」と判定された。一方で、遺伝毒性肝発がん物質のうち、2 物質が偽陰性となった。これらの物質のうち 1 つは肝発がん性がないという文献も見られるが、今後も調査・検討が必要である。

本試験系のさらなる有用性を確認することができたが、今後も本試験系の限界や改良についての検証を引き続き行う必要がある。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Hashimoto N, Kanie S, Yoshida S, Imaida K., Characteristics of surfactant proteins in tumorigenic and inflammatory lung lesions in rodents. J. Toxicol. Pathol., 31(4):231-240. 2018.
- 2) Yokohira M, Nakano-Narusawa Y, Yamakawa K, Hashimoto N, Yoshida S, Kanie S, Imaida K. Validating the use of napsin A as a marker for identifying tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in rodents. Exp. Toxicol. Pathol., 69(8): 637-642, 2017.
- 3) Kanie S, Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Yoshida S, Hashimoto N, Imaida K. Suppressive effects of the

expectorant drug ambroxol hydrochloride on quartz-induced lung inflammation in F344 rats. J. Toxicol. Pathol., 30(2):153-159. 2017.

**3 . その他**  
該当なし

## 2.学会発表

- 1) 横平政直、肺胞サーファクタントの役割と発癌リスク評価への応用 (The Role of Surfactant proteins and the Application for Assessment of the risk of Carcinogenesis) 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、日本毒性病理学会、沖縄、2018.01
- 2) 横平政直、肺過形成性病変の発癌リスク評価における napsin A の発現と予防作用検出の試み、がん予防学術大会 2018 高松、がん予防学会、2018.06

## G.知的所有権の取得状況

### 1 . 特許取得

該当なし

### 2 . 実用新案登録

該当なし

表 1 今回の検討で用いた被験物質についての情報

Cas.No	Name			
<b>遺伝毒性肝発がん物質</b>				
75-01-4	Vinyl chloride	和光純薬	228-02221	塩化ビニル標準液
101-80-4	4,4'-Oxydianiline	和光純薬	044-00781	4,4'-ジアミノジフェニルエーテル
101-14-4	4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline)	東京化成	M0609	4,4'-Methylenebis
121-14-2	2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene)	東京化成	D0856	2,4-Dinitrotoluene
13674-87-8	Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate	和光純薬	203-06892	りん酸トリス
480-54-6	Retrorsine	SIGMA	R0382	レトロルシン
<b>Ames(-)肝以外の臓器発がん性(+)</b>				
25013-16-5	Butylated hydroxyanisole (BHA)	abcam	ab142841	Butylated hydroxyanisole
60-56-0	Methimazole (MTZ)	abcam	ab142320	Methimazole
599-79-1	Sulfasalazine (SS)	SIGMA-ADRI	190-17022	スルファサラジン
<b>Ames(-)臓器発がん性(-)</b>				
107-18-6	Allyl alcohol (AA)	東京化成	A0218	Allyl Alcohol

表 2 今回の実験における群構成

Group	Name		Oral LD50	
			mg/kg	投与量 (1/3 of LD50)
1	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺伝毒性肝発がん物質 (陽性対照)	720	240
2	Vinyl chloride	遺伝毒性肝発がん物質	500	170
3	4,4'-Oxydianiline	遺伝毒性肝発がん物質	725	240
4	4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline)	遺伝毒性肝発がん物質	1140	380
5	2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene)	遺伝毒性肝発がん物質	286	100
6	Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate	遺伝毒性肝発がん物質	1850	620
7	Retrorsine	遺伝毒性肝発がん物質	34	10
8	Butylated hydroxyanisole (BHA)	Ames(-) 肝以外の臓器発がん性(+)	2000	670
9	Methimazole (MTZ)		2250	750
10	Sulfasalazine (SS)		15600	2000
11	Allyl alcohol (AA)	Ames(-) 臓器発がん性(-)	64	20
12	0.5% Methyl cellulose			5ml/kg b.w.

表3 被験物質の投与量の調整

Group	Name		Oral LD50 (rat) mg/kg	投与量 (1/3 of LD50)	被験物質 量 (mg)	Volume (5% mC ml)	投与濃度 (mg/5ml/kg b.w)
1	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺伝毒性肝発がん物質 (陽性対照)	720	240	480	10	240
2	Vinyl chloride	遺伝毒性肝発がん物質	500	170	340	10	170
3	4,4'-Oxydianiline	遺伝毒性肝発がん物質	725	240	480	10	240
4	4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline)	遺伝毒性肝発がん物質	1140	380	760	10	380
5	2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene)	遺伝毒性肝発がん物質	286	100	200	10	100
6	Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate	遺伝毒性肝発がん物質	1850	620	1240	10	620
7	Retrorsine	遺伝毒性肝発がん物質	34	10	20	10	10
8	Butylated hydroxyanisole (BHA)	Ames(-) 肝以外の臓器発がん性(+)	2000	670	1340	10	670
9	Methimazole (MTZ)		2250	750	1500	10	750
10	Sulfasalazine (SS)		15600	2000	4000	10	2000
11	Allyl alcohol (AA)	Ames(-) 臓器発がん性(-)	64	20	40	10	20
12	0.5% Methyl cellulose			5ml/kg b.w.		10	

表4 リアルタイム RT-PCR で用いたプライマー

遺伝子	プローブNo.	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
1385132_at	#46	ggtagtggtgaagtcagtttcca	ttttctgaagatgccaagca
Aen	#112	ggcctgccctcactctaaa	agcggtaagaaagctctgga
Atp6v1f	#105	tgaaatcgaagacactttcagg	gctccttggacgggatct
Rage	#66	ccagtcacaactggtcatcttc	cagactagtcggcccctgt
Cdkn1a	#21	gatccacagcgatacgcagac	acatcaccaggatcggacat
Fam49a	#56	cacactcttctcggatcttga	aggatgctctcggatcttg
Glr3	#53	ccacagtgtgtacagatgaacg	aacagcttcggcttccag
Nudt5	#78	ggctacaaaggtgacatggct	gcagtttgacaagcctggat
Phlda3	#10	accacgaggcataccatctt	caaccaaccaagtgacag
RGD1308114	#60	atggcctcgttatggagatg	tgctctgacatcttgaacttg

表5 リアルタイム RT-PCR の結果

	G1	G3	G4	G5	G6
Gene Symbol	Log 2-Nitrosopropane	Log 4,4'-Oxydianiline	Log 4,4'-Methylene	Log 2,4-Dinitrotruenene	Log Tris
Glrx3	2.29	0.19	2.85	0.78	1.35
Nudt5	1.91	0.21	2.56	0.75	1.13
Phlda3	3.54	-0.48	2.36	0.39	0.76
Cdkn1a	5.14	1.06	4.23	1.37	2.04
Atp6v1f	2.00	0.27	1.96	0.62	0.70
Rage	4.46	0.24	3.54	0.90	1.25
Aen	5.71	1.02	3.74	1.14	1.64
1385132_at	5.01	-0.25	5.93	1.73	2.07
RGD1308114	-3.04	-0.14	-3.07	-1.68	0.08
Fam49a	2.53	0.68	2.27	0.80	1.11
	G7	G8	G9	G10	G11
Gene Symbol	Log Retororsine	Log Butylated hydroxyanisole	Log Methimazole	Log Sulfasalazine	Log Allyl alcohol
Glrx3	0.47	0.30	1.52	0.46	0.04
Nudt5	0.73	0.67	2.05	0.53	0.04
Phlda3	0.70	0.18	1.10	-0.30	0.01
Cdkn1a	2.93	0.01	0.06	-0.06	0.10
Atp6v1f	0.10	0.12	1.05	0.45	0.31
Rage	1.25	0.62	1.07	0.45	0.14
Aen	1.79	0.59	2.46	0.45	0.14
1385132_at	2.80	-0.17	0.70	-1.11	0.17
RGD1308114	-1.26	0.21	0.44	0.88	-0.04
Fam49a	0.81	0.51	0.71	0.50	0.22

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）  
分担研究項目：遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立

研究分担者 塚本徹哉 藤田医科大学医学部病理診断学 教授

## 研究要旨

ヒトを取り巻く環境中の様々な化学物質の曝露は発がん要因の1つとして重要であり、その発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は喫緊の課題である。本研究では、遺伝毒性発がん性マーカーセットにより、遺伝毒性肝発がん性を判定できる24時間ラット超短期動物試験系を用い、化学物質の肝発がん性の評価法を検討した。遺伝毒性肝発がん物質（2-Nitropropane、Nitrosoheptamethyleneimine、Ethylene thiourea、Benzidine、Auramine-O、Hydrazine）およびその他の化学物質（Furosemide、Chlorpheniramine、Chlorpropamide、Methyldopa）を含めた種々の化学物質10種類について、6週齢オス Sprague-Dawley (SD)ラット単回強制胃内投与試験を行い、24時間後に肝から total RNA を抽出後、real time RT-PCR 法により10遺伝子（1385132\_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114）の発現データを取得した。対照群を0としたときの Ct 値を用いて、サポートベクターマシーン (SVM)による肝発がん性予測数理学的モデルを用いて解析した結果、概ね、遺伝毒性肝発がん物質とその他の化学物質の分離が可能であった。しかし、従来の知見と異なる評価となった物質に関しては化学物質特異的な代謝等、今後更なる検討が必要と考えられた。

## A. 研究目的

ヒトを取り巻く環境中の様々な化学物質の曝露は発がん要因の1つとして重要であり、その発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は喫緊の課題である。本研究では、トキシコゲノミクス手法から得た遺伝毒性発がん性マーカーセットにより、遺伝毒性・発がん性を判定できるラット超短期動物試験系を用い、化学物質の遺伝毒性・発がん性評価法の確立を目指す。

## B. 研究方法

0.5% Methyl cellulose (MC)を溶媒として、11種類の化学物質を用いた。

陽性対照として既知の Group 1 (G1): 180 mg/kg BW 2-Nitropropane と G2: 240 mg/kg 体重 (body weight, BW) 2-Nitropropane を用いた。今回5種類の遺伝毒性肝発がん物質として、G3: 90 mg/kg BW Nitrosoheptamethyleneimine, G4: 610 mg/kg BW Ethylene thiourea、G5: 100 mg/kg BW Benzidine、G6: 500 mg/kg BW Auramine-O、G7: 20 mg/kg BW Hydrazine を使用した。その他の化学物質として、G8: 870 mg/kg BW Furosemide (FUR)、G9: 40 mg/kg BW Chlorpheniramine (CHL)、G10: 720 mg/kg BW Chlorpropamide (CPP)、G11: 1670 mg/kg BW Methyldopa (MDP)を用いた。また、G12として0.5% Methyl cellulose (MC)投与群を設けた。

DIMS 医科学研究所において、以上の群について、6週齢オス Sprague-Dawley (SD)ラット単回強制胃内投与試験（各群5匹）を行い、24時間後に剖検を行い、得られた肝組織の一部を凍結保存した。藤田医科大学にて、肝組織から total RNA を抽出 (RNeasy mini kit, QIAGEN) 後、cDNA を作製 (SuperScript IV VILO Mater Mix, ThermoFisher) した。18S rRNA を内部

標準として (Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control, ThermoFisher) 昨年と同様の10遺伝子 (1385132\_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) について、ABI PRISM-7900HT を用いて、標識した Roche Universal Primer を使い、real time RT-PCR 法により遺伝子発現データを取得した。結果は、対照群を0としたときの Ct 値で表した。その値を、大阪市大で構築済の肝発がん性予測モデル (サポートベクターマシーン (SVM)による数理学的アルゴリズムによるモデル) に入力し、遺伝毒性肝発がん性の評価を行った。

## C. 研究結果

G12 を0とした時の10遺伝子 (1385132\_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) の Ct 値は、それぞれ以下の通りであった。

G12 を0とした時の10遺伝子の  $\Delta\Delta Ct$  値は、Groups : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 について、それぞれ以下の通りであった。

1385132\_at : 5.55, 4.41, 3.24, -0.24, 0.36, 1.94, 0.53, -0.38, 0.07, 0.14, 0.06  
Aen : 4.43, 4.92, 2.92, 0.66, 0.96, 1.75, 1.38, 1.41, 1.5, 1.2, 1.57  
Atp6v1f : 2.49, 2.13, 1.22, 0.94, 0.76, 1.29, 1.17, 0.69, 0.89, 1, 0.87  
Cdkn1a : 5.65, 5.39, 3.55, 1.84, 0.47, 0.96, 1.18, 1.06, 1.35, 0.43, 2.02  
Fam49a : 2.82, 2.75, 1.92, 0.71, 0.78, 1.3, 1.25, 1.14, 1.38, 0.95, 1.16  
Glrx3 : 3.55, 3.22, 1.79, 0.79, 0.77, 1.28,

1.15, 0.84, 1.02, 1.03, 0.82  
Nudt5: 2.95, 2.4, 1.39, 0.68, 0.73, 1.23, 1.32,  
0.68, 0.91, 0.77, 0.44  
Phlda3: 4.11, 4.28, 2.65, 0.66, 0.76, 1.23,  
1.11, 0.83, 1.41, 1.08, 1.18  
RGD1308114: -4.02, -3.46, 0.01, 0.12, 0.4,  
-1.61, 0.72, 0.98, 1.22, 1.27, 1.09  
Rage: 4.96, 5.05, 2.73, 1.02, 0.96, 1.09, 1.29,  
0.91, 1.24, 0.25, -0.27

SVMによる解析の結果では、G3-7の被験物質のうち、2物質は陽性判定となったが、3物質は陰性判定となった。

#### D. 考察

SVMによる予測モデルによる解析の結果、陽性対照の2群、180と240mg/kg BW群では、各遺伝子のCt値に大きな差はなく、良好な再現性が得られた。他の5つの遺伝毒性肝発がん物質のうち2物質は予測通り陽性の判定となったが、3物質は陰性の判定であった。real-time PCRデータのバラツキは最小限と考えられたため、遺伝毒性肝発がん性とともに、化学物質自体の代謝特異性による変化も考えられた。

非遺伝毒性肝発がん物質予測通りに陰性と評価された。

#### E. 結論

24時間という超短期間で、10遺伝子の発現量の変動を解析することにより、概ね遺伝毒性肝発がん性の予測が可能なモデルの構築が可能と判断されたが、化学物質代謝特異性等、今後の検証が必要なデータも得られ、今後更なる検討が必要と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakagawa, M., Sakai, Y., Kiriyama, Y., Tahara, T., Horiguchi, N., Okabe, A., Tahara, S., Shibata, T., Ohmiya, N., Kuroda, M., Sugioka, A., Tsukamoto, T. Eradication of *Helicobacter pylori* Induces Immediate Regressive Changes in Early Gastric Adenocarcinomas. *Pathobiology*: 2019 [Epub ahead of print]
- 2) Okabe, A., Kiriyama, Y., Suzuki, S., Sakurai, K., Teramoto, A., Kato, H., Naiki-Ito, A., Tahara, S., Takahashi, S., Kuroda, M., Sugioka, A., Tsukamoto, T. Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker gamma-H2AX. *J Toxicol Pathol.* 2019; 32: 91-99.
- 3) Tahara, S., Tahara, T., Horiguchi, N., Kato, T., Shinkai, Y., Yamashita, H., Yamada, H., Kawamura, T., Terada, T., Okubo, M., Nagasaka, M., Nakagawa, Y., Shibata, T., Yamada, S., Urano, M., Tsukamoto, T., Kurahashi, H., Kuroda, M., Ohmiya, N. DNA methylation accumulation in gastric mucosa adjacent to cancer after

*Helicobacter pylori* eradication. *Int J Cancer.* 2019; 144: 80-88.

##### 2. 学会発表

- 1) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、フアインチューニングした Deep Convolutional Neural Networks によるヒト肺癌細胞像の自動分類. 第107回日本病理学会総会、札幌(2018年6月)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。



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

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）  
分担研究項目：遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立

研究代表者 鰐淵英機 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 教授

## 研究要旨

本研究は化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化を可能とする評価モデルの構築を目的とし、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの開発および検証を行った。遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質 30 物質についてラット単回投与を行い、投与 24 時間後の肝臓におけるマーカー遺伝子（10 遺伝子）の発現データを qPCR で取得し、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いて肝発がん性を予測した。その結果、遺伝毒性肝発がん物質 13 物質のうち、6 物質について陽性判定が得られ（感度 46%）、その他の全ての物質（15 物質）で陰性判定が得られた（特異度 100%）。平成 29 年度に比して感度が低い理由として、今回投与した用量と腫瘍発生率が 50%となる用量（TD50）に差が少なかった物質が多く含まれた可能性がある。肝発がん性予測モデルのより高い精度を目指して、投与量の設定や陰性と判定された理由について検討する必要性が生じた。一方、特異度は 100%で本検出モデルの特異性を強く示せた。

### A．研究目的

生活環境を取り巻く化学物質の発がん性を迅速にかつ高精度に検証できるシステムの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、システムで得られた結果は国民生活の安全・安心を保障する重要な基盤となる。本研究では化学物質の発がん性評価の迅速化・高精度化・標準化を目的に、平成23年度～28年度「化学物質の安全性と発がん性リスク評価としての短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究」（吉見班）で蓄積してきた病理組織発がんマーカー及び試験法をより一層発展・高精度化し、高精度発がん評価モデルとして確立する。さらに国際的に認知させる必要があるため、それらの発がん性評価法のOECDテストガイドライン化を目指すことが重要である。そこで、本申請研究においては、OECDテストガイドライン化の成立を最終目的として、6研究施設による協同体制にて下記に記す三つの研究を実施する。第一に、膀胱を標的とする発がん物質を用いた28日間反復投与試験及び大腸を標的とする発がん物質を用いた90日間反復投与試験を実施し、病理組織発がんマーカーを用いた大腸及び膀胱発がんリスク評価法を確立する。第二に、これまで開発した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性をより一層検証し、確立する。第三に、上記の試料を用いてDNA付加体を網羅的に解析しカタログ化する方法（アダクトーム解析）による化学物質のDNA損傷を指標とした遺伝毒性評価法を開発する。

平成 30 年度は、我々が構築した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルを確立するために、13 種類の遺伝毒性肝発がん物質及び 15 種類のそれ以外の化合物（非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の発がん物質、非発がん物質）を「陰性」と判定する。その結果、遺伝毒性肝発がん物質 13 物質のうち、6 物質について陽性判定が得られ（感度 46%）、その他の全ての物質（15 物質）で陰性判定が得られた（特異度 100%）。また、今回用いた遺伝毒性肝発がん物質について、その投与した用量と腫瘍発生率が 50%となる用量（TD50）を比較検討した結果、大半が「投与量/TD50」比率が 100 以下であり（表 2）、平成 29 年度（平均：531）に比べ、低いこ

発がん物質）について、ラット単回投与試験を行い、得られた遺伝子発現データを予測モデルに入力し、判定を行った。

### B．研究方法

遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質 28 種類について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。動物試験および遺伝子解析は 3 施設（香川大・藤田医科大・大阪市立大）で行われた。

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

（倫理面への配慮）

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

### C．研究結果

各施設で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った（表 1）。本モデルでは、遺伝毒性肝発がん物質を「陽性」、その他の物質（非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の発がん物質、非発がん物質）を「陰性」と判定する。その結果、遺伝毒性肝発がん物質 13 物質のうち、6 物質について陽性判定が得られ（感度 46%）、その他の全ての物質（15 物質）で陰性判定が得られた（特異度 100%）。また、今回用いた遺伝毒性肝発がん物質について、その投与した用量と腫瘍発生率が 50%となる用量（TD50）を比較検討した結果、大半が「投与量/TD50」比率が 100 以下であり（表 2）、平成 29 年度（平均：531）に比べ、低いこ

とが判明した。

## D. 考察

遺伝毒性肝発がん物質 13 物質のうち、7 物質について陰性と判定された原因の一つとして、今回の投与量と TD50 の関係が挙げられる。表 2 に示すとおり発癌を示す投与量に対する今回の投与量の差が少ないため、遺伝子発現変化も結果的に小さくなり、偽陰性として判定された可能性がある。平成 29 年度では、10 化学物質中 8 つが「投与量/TD50」比率が 100 以上と高い値を示す。今後、精度を上げるには許容される最大容量を用いる必要性も考える。

表 1 遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた判定結果

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

表 2 遺伝毒性肝発がん物質の判定結果および TD50 との関係

被検物質	投与量 (mg/kg)	判定結果	TD50 (mg/kg/day)	Folds (投与量/TD50)
2-Nitropropane (2-NP) (陽性対照物質)	240	Positive	-	-
Nitrosoheptamethyleneimine (NHMI)	90	Positive	0.0378	2381
Ethylene thiourea (ETU)	610	Negative	8.13	75
Benzidine (BZ)	100	Negative	1.73	58
Auramine-O (AO)	500	Positive	11	45
Hydrazine (HZ)	20	Negative	0.613	33
4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)	240	Negative	9.51	25
4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline) (MBOCA)	380	Positive	19.3	20
Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate (TDCPP)	620	Positive	46.4	13
Retrorsine (RTS)	10	Positive	0.862	12
Vinyl bromide (VB)	170	Negative	18.5	9
Dichloroacetic acid (DCA)	940	Negative	161	6
Hydrazine sulfate (HS)	200	Negative	40.8	5
Acid Red 26 (AR-26)	2000	Positive	415	5

## E. 結論

我々が構築した遺伝子セットを用いた肝発がん性予測モデルは、去年度に比べ感度が低くなったが、その理由として、今回用いた投与量が発がん用量に近い容量設定で行ったための可能性がある。一方で特異度は 100%と、特異度は 100%で本検出モデルの特異性を強く示せた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, Wanibuchi H. Acetoaceto-o-toluidide enhances cellular proliferative activity in the urinary bladder of rats. *Toxicol Sci*. 2019, in press.
- Okuno T, Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. mTOR Activation in Liver Tumors Is Associated with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Both Mouse Models and Humans. *Cancers (Basel)*. 2018; 10: 465.
- Gi M, Fujioka M, Yamano S, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Yamaguchi T, Tago Y, Kitano M, Hayashi SM, Wanibuchi H. Chronic dietary toxicity and carcinogenicity studies of dammar resin in F344 rats. *Arch Toxicol*. 2018; 92: 3565-83.
- Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. In vivo positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats. *Arch Toxicol*. 2018; 92: 3207-21.
- Fukushima S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Matsumoto M. Quantitative Approaches to Assess Key Carcinogenic Events of Genotoxic Carcinogens. *Toxicol Res*. 2018; 34: 291-6.
- Shimizu Y, Tamada S, Kato M, Takeyama Y, Fujioka M, Kakehashi A, Nakatani T, Wanibuchi H, Gi M. Steroid sulfatase promotes invasion through epithelial-mesenchymal transition and predicts the progression of bladder cancer. *Exp Ther Med*. 2018; 16: 4463-70.
- Oikawa D, Shiota M, Tokunaga F, Wanibuchi H. Generation of Rat Monoclonal Antibodies Specific for DZIP3. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2018; 37: 153-7.
- Oikawa D, Shiota M, Goto E, Komakura K, Wanibuchi H, Tokunaga F. Generation of Rat Monoclonal Antibodies Against a Deubiquitinase, Ovarian Tumor Domain-Containing Protein 1. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2018; 37: 180-4.
- Kitajima S, Lee KL, Fujioka M, Sun W, You J, Chia GS, Wanibuchi H, Tomita S, Araki M, Kato H, Poellinger L. Hypoxia-inducible factor-2 alpha up-regulates CD70 under hypoxia and enhances anchorage-independent growth and aggressiveness in cancer cells. *Oncotarget*. 2018; 9: 19123-35.

### 2. 学会発表

- 1) 鰐淵英機、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕．環境化学物質による発がん<sup>1</sup>と細胞傷害・修復の破綻．第 107 回日本病理学会総会、北海道（2018 年 6 月）（ワークショップ）
- 2) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、魏民、鰐淵英機．非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の肝細胞と肝がんにおけるプロテオーム解析．第 107 回日本病理学会総会、北海道（2018 年 6 月）
- 3) 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、魏民、鰐淵英機．NASH 由来の肝細胞癌における mTOR の活性化．第 107 回日本病理学会総会、北海道（2018 年 6 月）
- 4) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、鰐淵英機．職業性胆管がんにおける疫学的および動物モデルでの知見．第 25 回日本がん予防学会学術総会、香川（2018 年 6 月）
- 5) 行松直、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機．o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性の検討．第 33 回発癌病理研究会、静岡（2018 年 8 月）
- 6) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機．有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid のマウス経胎盤ばく露による発がん機序の検討．第 77 回日本癌学会学術総会、大阪（2018 年 9 月）
- 7) 奥野高裕、行松直、藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐淵英機．Acetoaceto-o-toluidide はラット膀胱上皮細胞の増殖と DNA 傷害を誘発する．第 77 回日本癌学会学術総会、大阪（2018 年 9 月）
- 8) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、藤岡正喜、多胡善幸、魏民、鰐淵英機．メタボリックシンドロームモデル TSOD マウスにおける NASH 肝臓組織及び腫瘍のメタボローム解析．第 77 回日本癌学会学術総会、大阪（2018 年 9 月）
- 9) 魏民、藤岡正喜、奥野高裕、行松直、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機．ラットにおける 1,4-dioxane の変異原性と発がん性の定量的解析．第 77 回日本癌学会学術総会、大阪（2018 年 9 月）
- 10) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機．マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序．日本毒性学会生体金属部会主催メタルバイオサイエンス研究会 2018、宮城（2018 年 11 月）
- 11) 奥野高裕、行松直、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機．職業性膀胱癌に関わるヒト膀胱癌の特徴と実験病理学的解析．第 18 回分子予防環境医学研究会大会、愛知県（2019 年 1 月）
- 12) 行松直、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機．o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性、発がんプロモーション作用の検討．第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都（2019 年 1 月）
- 13) 山口貴嗣、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機．ジフェニルアルシン酸の F344 ラットにおける慢性毒性試験及び発がん性試験．第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都（2019 年 1 月）
- 14) 魏民、藤岡正喜、行松直、奥野高裕、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機．BBN 誘発マウス膀胱がんモデルにおける Acetazolamide の予防効果の検討．第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都（2019 年 2 月）
- 15) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、多胡善幸、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機．NASH モデル TSOD マウスにおける肝臓腫瘍および肝臓組織のメタボローム解析．第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都（2019 年 2 月）
- 16) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機．有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の経胎盤ばく露によるマウス肺発がん過程におけるヒストン修飾異常．第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都（2019 年 2 月）

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

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

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）  
分担研究項目：網羅的な DNA 付加体解析法を用いた化学物質の DNA 損傷性評価

研究分担者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所発がん・予防研究分野 ユニット長

## 研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、DNA 付加体の網羅的解析手法(DNA アダクトーム法)の構築に取り組んできた。本年度は、肝発がん性検出評価系の再現性確認と施設間バリデーション試験の実施に用いたラット肝臓サンプルを用い、複数の遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価を、アダクトーム法により検討した。遺伝毒性ラット肝発がん物質として、2-Nitropropane (2-NP ; 陽性対照) o-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 4,4'-Thiodianiline (TDA)、N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), Nitrosodibutylamine (NB), N-Nitrosopyrrolidine (NNP), 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (MDA)、遺伝毒性非発がん物質 ; Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT)、非遺伝毒性肝発がん物質 ; Monocrotaline (MCT), Phenobarbital (PB)、非遺伝毒性非肝発がん物質 : Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI), Indomethacin (IM), Phenylbutazone (PhB), Promethazine (PMZ), Sulindac (SUL), Tetracycline (TC), Ethionamide (ETH), Theophylline (TEO), Caffeine (CAF), Chloramphenicol (CMP)をそれぞれラットに投与し、24 時間後に肝臓に生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。得られたデータを主成分解析(PCA-DA)解析により分類したところ、コントロール及び非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の 4 つのグループに分離されることがわかった。遺伝毒性肝発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質から得られたデータをそれぞれ別々に PCA した結果、両者ともコントロールと分離されてはいるものの、非遺伝毒性非肝発がん物質ではあまりコントロールとの距離が離れていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいことが予測された。今後、これら付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても検討を行なう予定である。

## A . 研究目的

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

LC-MS を用いたアダクトーム解析により検討し、DNA 付加体の生成を指標とした有害性評価の検証を行なう。

## B . 研究方法

雄性 SD ラット (各群それぞれ 5 匹) に遺伝毒性肝発がん物質 ; 2-Nitropropane(2-NP ; 陽性対照), o-Aminoazotoluene(AAT), Dimethylnitrosamine(DMN), 4,4'-Thiodianiline(TDA), N-Nitrosodiethylamine(NDEA), N-Nitrosodiethanolamine(NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine(NEMA), Nitrosodibutylamine(NB), N-Nitrosopyrrolidine(NNP), 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene(MDA)、遺伝毒性非発がん物質 ; Cyclophosphamide(CPA), Nitrofurantoin(NFT), Phenacetin(PCT)、非遺伝毒性肝発がん物質 ; Monocrotaline(MCT), Phenobarbital(PB)、非遺伝毒性非肝発がん物質 ; Diazepam(DZP), Disulfiram(DSF), Phenytoin(PHE), Rotenone(ROT), Tolbutamide(TLB), Aspirin(ASA), Triamterene(TRI), Indomethacin(IM), Phenylbutazone(PhB), Promethazine(PMZ), Sulindac(SUL), Tetracycline(TC), Ethionamide(ETH), Theophylline(TEO), Caffeine(CAF), Chloramphenicol(CMP) を各種

濃度（表1参照）で投与を行った後24時間後に肝臓を摘出した。DNAを抽出後、DNaseI、ヌクレアーゼP1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、LC-TOFMSに供しDNA付加体の網羅解析を行った。得られたデータはSCIEX社が提供するバイオインフォマティクス解析ソフトウェアを用い、デオキシリボヌクレオシドに特徴的なニュートラルロス（-116.04736）及び各種核酸に特異的なニュートラルロス（-152.0572; dG, -136.0623; dA, -112.0511; dC, -127.0508; dT）を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように系をデザインした。得られたデータを主成分（PCA-DA）解析により解析した。

（倫理面への配慮）

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

### C. 研究結果

各種化学物質を投与したラット肝臓DNAのアダクトーム解析を行なった結果を図1に示す。PCA-DA解析を行なったところ、コントロール及び非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。前回の報告と同じく、非遺伝毒性非発がん物質及びコントロール、遺伝毒性肝発がん物質でPCA-DA会席を行ったところコントロールと非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の2つのグループに分離できた（図2）。非遺伝毒性非発がん物質ではあまりコントロールと分離が出来ていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいたことが予測された。遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質では距離があまり離れていないプロットが存在した。そこで、遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質においてコントロールとともにPCA-DA解析を行ったところコントロールと遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質それぞれで分離することができた（図3）。そのため、非遺伝毒性物質と遺伝毒性非発がん物質は本来であれば、別の物質として区別することは出来るが、コントロールや非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質と比較すると比較的差が小さいため分離が出来なかったと予測された。しかし、非遺伝毒性肝発がん物質は遺伝毒性非発がん物質と比べ比較的遺伝毒性肝発がん物質よりプロットしている傾向があることから、プロットにおいて、発がん性の有無の要素の関与が大きいと予測された。これらのことから、発がんに関与する物質であるDNA付加体が生成していることが推測される。

一方、ボルケーノプロットより、遺伝毒性肝発がん物質に特徴的な付加体を幾つかスクリーニングした。In-house databaseとの比較から、adduct\_545( $m/z$  282.1185)はホルムアルデヒド、アルキル化剤、マロンジアルデヒドのいずれかに由来する付加体である可能性が示唆された（図4, 5）。また、adduct\_75( $m/z$  569.1211)はその $m/z$ 値及びフラグメンテーションのデータから、d

Aを含む付加体であることが示唆された（図6）。

表1 使用した化学物質

	遺伝毒性	発がん性	投与量(mg/kg b.w.)
o-Aminoacetoluric acid (AA7)	+	+	500
Dimethylsulfoxide (DMSO)	+	+	10
4,4'-Thiobis(maleimide) (TDA)	+	+	300
2-Nitropropane (2-NP, 硝基烷醇)	+	+	240
N-Nitrosodimethylamine (NDEA)	+	+	70
N-Nitrosodimethylamine-N-oxide (NDMA)	+	+	2000
N-Nitrosodimethylamine (NMA)	+	+	30
Nitrosodimethylamine (NDB)	+	+	400
N-Nitrosopyrrolidine (NDP)	+	+	300
3-Methyl-4-dimethylaminosulfonamide (M4DA)	+	+	500
Cyclophosphamide (CPA)	+	-	30
Nitrosamine (NF7)	+	-	200
Phenacetin (PC7)	+	-	550
Methacrylonitrile (MCT)	-	+	20
Phenobarbital (PB)	-	+	50
Diazepam (DZP)	-	-	80
Diazepam (DZF)	-	-	170
Phenacetin (PHE)	-	-	550
Racemate (RGT)	-	-	20
Tetrahydrozoline (TLB)	-	-	830
Arginine (ASA)	-	-	70
Tetraethylenediamine (TEA)	-	-	130
Indomethacin (IND)	-	-	1
Phenylthiourea (PTB)	-	-	80
Phenethylamine (PEA)	-	-	150
Salicylic acid (SAL)	-	-	90
Tetraethylamine (TEA)	-	-	270
Ethionamide (ETA)	-	-	440
Thiophylline (TEO)	-	-	80
Caffeine (CAF)	-	-	60
Chloramphenicol (CMP)	-	-	830
0.2% Methylcellulose (M.C. 増粘剤)	-	-	5ml/kg

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

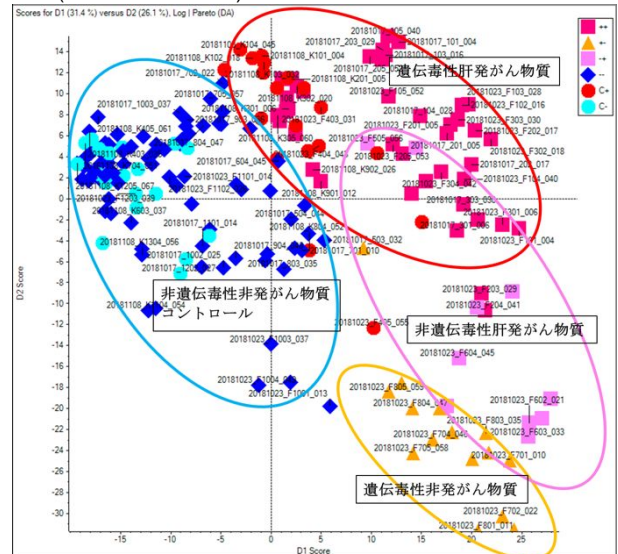


図2 コントロール/非遺伝毒性非発がん物質/遺伝毒性肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価（PCA-DA解析による）

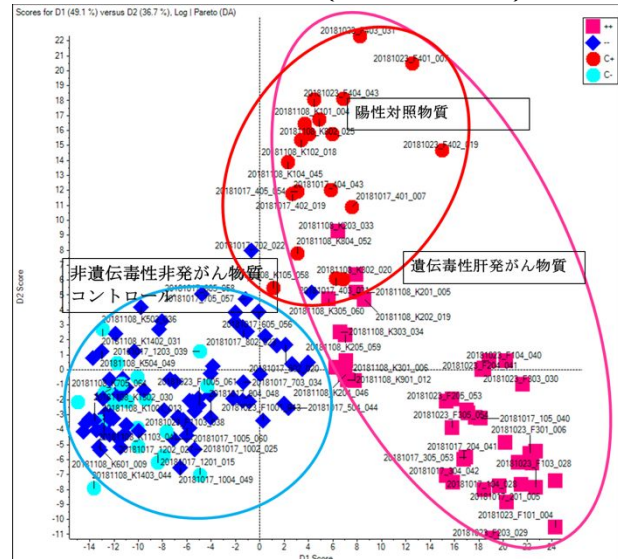




図3 非遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非発がん物質/の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA-DA解析による)

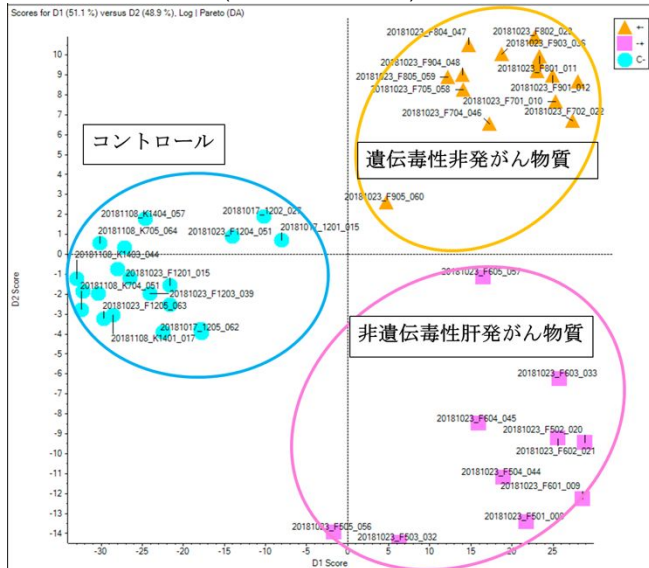


図4 ボルケーノプロットと Adduct 545 の MS fragment data

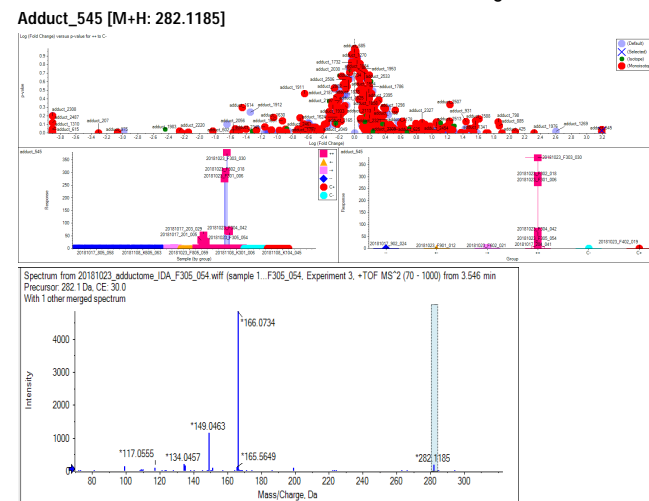
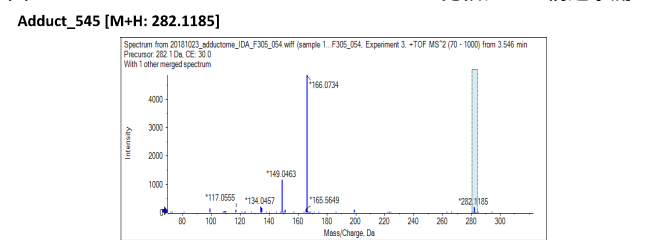


図5 Adduct 545 の in-house database との比較による構造予測



付加体データベースとの比較による構造探索

Adduct ID	M/Z [M+H]	データベースとの比較 [M+H]	付加体の由来
Adduct_545	282.1185	N <sup>6</sup> -HmdA (282.1202→166.0728), O <sup>6</sup> -MedG (282.1202→166.0728), MDA-dC (282.1090→166.0616)	Formaldehyde、 アルキル化剤、 MDA

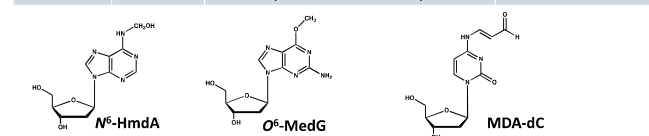
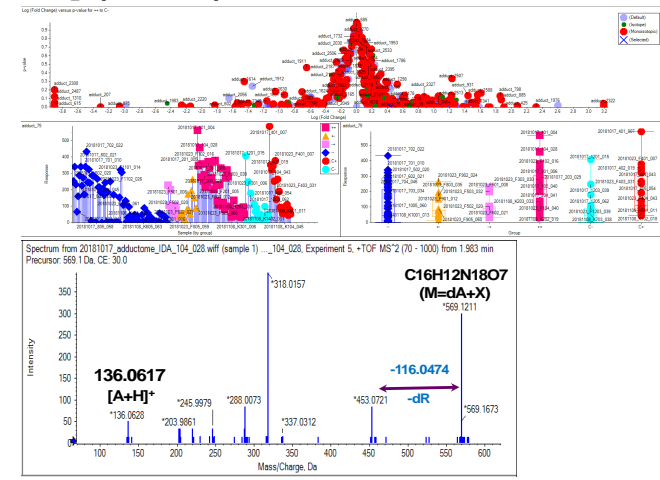


図6 ボルケーノプロットと Adduct 75 の MS fragment data



### D. 考察

遺伝毒性/非遺伝毒性非肝発がん物質を投与したラットの肝臓からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅解析を行なった。PCA-DA解析を行なったところ、コントロール及び非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。前回の報告と同じく、非遺伝毒性非発がん物質及びコントロール、遺伝毒性肝発がん物質でPCA-DA解析を行ったところコントロールと非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の2つのグループに分離できた。非遺伝毒性非発がん物質ではあまりコントロールと分離が出来ていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいために予測された。遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質は距離があまり離れていないプロットが存在した。そこで、遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質、コントロールの3つの群のみでPCA-DA解析を行ったところコントロールと遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質それぞれで分離することが出来た。そのため、非遺伝毒性物質と遺伝毒性非発がん物質は本来であれば別の物質として区別することはできるが、コントロールや非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質と比較すると比較的差异が小さいため分離できないと考えられる。しかし、非遺伝毒性肝発がん物質は遺伝毒性非発がん物質と比べ比較的遺伝毒性肝発がん物質よりにプロットしている傾向があることから、プロットにおいて、発がん性の有無の要素の関与が大きいと予測された。これらのことから、発がんに関与する物質であるDNA付加体が生成していることが考えられる。

### E. 結論

遺伝毒性ラット肝発がん物質として、2-NP(陽性対照) AAT, DMN, TDA, NDEA, NDELA, NEMA, NB, NNP, MDA, 遺伝毒性非発がん物質として、CPA, NFT, PCT, 非遺伝毒性肝発がん物質として、MCT, PB, 非遺伝毒性非肝発がん物質としてDZP, DSF, PHE, ROT, TLB, ASA, TR1, IM, PhB, PZ, SUL, TC, ETH, TEO, CAF, CMPをそれぞれラットに投与し、24時間後に肝臓に生成されるDNA付加体を網羅的に解析した。PCA-DAにより、コントロール及び非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、

遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。前回の報告と同じく、非遺伝毒性非発がん物質及びコントロール、遺伝毒性肝発がん物質でPCA-DA解析を行ったところコントロールと非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の2つのグループに分離できた(図2)。非遺伝毒性非発がん物質ではあまりコントロールと分離が出来ていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいことが予測された。遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質においてコントロールとともにPCA-DA解析を行ったところコントロールと遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質それぞれで分離することができた。そのため、非遺伝毒性物質と遺伝毒性非発がん物質は本来であれば、別の物質として区別することはできるが、コントロールや非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質と比較すると比較的差が小さいため分離が出来なかったと予測された。しかし、非遺伝毒性肝発がん物質は遺伝毒性非発がん物質と比べ比較的遺伝毒性肝発がん物質よりもプロットしている傾向があることから、プロットにおいて、発がん性の有無の要素の関与が大きいと予測された。つまり、発がんに関与する物質であるDNA付加体が生成していることが推測される。一方、ボルケーノプロットより、遺伝毒性肝発がん物質に特徴的な付加体を幾つかスクリーニングした。In-house databaseとの比較から、adduct\_545(*m/z* 282.1185)はホルムアルデヒド、アルキル化剤、マロンジアルデヒドのいずれかに由来する付加体である可能性が示唆された。また、adduct\_75(*m/z* 569.1211)はその*m/z*値及びフラグメンテーションのデータから、dAを含む付加体であることが示唆された。今後、これら付加体の同定を行うと同時に、別の化学物質を投与したラット肝臓についても同様に検討を行う予定である。

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

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Fukai, E, Sato, H, Watanabe, M, Nakae, D,; Totsuka, Y, Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 2018, 109, 1024-1031.
2. Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology*, 2018, 38:537-543.

### 2. 学会発表

1. 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: Fe<sup>3</sup>O<sub>4</sub>ナノ粒子の曝露された癌細胞におけるmicroRNAsのプロファイリングについて(II) 第77回日本癌学会総会(大阪、2018年9月)
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)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし。



**2. 実用新案登録**

該当なし。

**3. その他**

該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okuno T, <u>Gi M</u> , Fujioka M, Yukimatu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, Wanibuchi H.	Acetoaceto-o-toluidide enhances cellular proliferative activity in the urinary bladder of rats.	Toxicol Sci			In press
Sone M, <u>Toyoda T</u> , Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Morikawa T, Nishikawa A, Ogawa K	Immunohistochemistry of $\gamma$ -H2AX as a method of early detection of urinary bladder carcinogenicity in mice	J Appl Toxicol			in press
<u>Toyoda T</u> , Cho YM, Matsushita K, Tachibana S, Senuma M, Akagi J, Ogawa K	A 13-week subchronic toxicity study of hexyl acetate in SD rats	J Toxicol Pathol			in press
Nakagawa, M, Sakai, Y, Kiriyama, Y, Tahara, T, Horiguchi, N, Okabe, A, Tahara, S, Shibata, T, Ohmiya, N, Kuroda, M, Sugioka, A, <u>Tsukamoto, T</u>	Eradication of Helicobacter pylori Induces Immediate Regressive Changes in Early Gastric Adenocarcinomas.	Pathobiology			In press
<u>Toyoda T</u> , Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K	Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and $\gamma$ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with o-toluidine and o-anisidine	Arch Toxicol	93	753-62	2019

Yang Q, Yasuda T, Choi E, <u>Toyoda T</u> , Roland JT, Uchida E, Yoshida H, Seto Y, Goldenring JR, Nomura S	MEK inhibitor reverses metaplasia and allows re-emergence of normal lineages in <i>Helicobacter pylori</i> -infected gerbils	Gastroenterology	156	577-81	2019
Hirata T, Cho YM, Suzuki I, <u>Toyoda T</u> , Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K	4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC) induced apoptotic cell death and G2/M cell cycle arrest via ROS production in human esophageal epithelial cancer cells	J Toxicol Sci	44	73-81	2019
Funahashi S, Okazaki Y, Nagai H, Chew SH, Ogawa K, <u>Toyoda T</u> , Cho YM, Toyokuni S	Twist1 was detected in mesenchymal cells of mammary fibroadenoma and invasive components of breast carcinoma in rats	J Toxicol Pathol	32	19-26	2019
Mapoung, S, <u>Suzuki S</u> , Fuji, S, Naiki-Ito, A, Kato, H, Yodkeeree, S, Ovatlarnporn, C, Takahashi, S, Limtrakul, P	Cyclohexanone curcumin analogs inhibit the progression of castration resistance prostate cancer in vitro and in vivo	Cancer Sci	110	596-607	2019
Okabe, A, Kiriya ma, Y, <u>Suzuki S</u> , Sakurai, K, Teramoto, A, Kato, H, Naiki-Ito, A, Tahara, S, Takahashi, S, Kuroda, M, Sugioka, A, <u>Tsukamoto, T</u>	Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker gamma-H2AX.	J Toxicol Pathol	32	91-99	2019
Tahara, S, Tahara, T, Horiguchi, N, Kato, T, Shin kai, Y, Yamashita, H, Yamada, H, Kawamura, T, Terada, T, Okubo, M, Nagasaka, M, Nakagawa, Y, Shibata, T, Yamada, S, Urano, M., <u>Tsukamoto, T</u> , Kurahashi, H, Kuroda, M, Ohmiya, N	DNA methylation accumulation in gastric mucosa adjacent to cancer after Helicobacter pylori eradication.	Int J Cancer	144	80-88	2019

Okuno T, Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, <u>Gi M</u> , Wanibuchi H.	mTOR Activation in Liver Tumors Is Associated with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Both Mouse Models and Humans	Cancers (Basel)	10	465	2018
<u>Gi M</u> , Fujioka M, Yamano S, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Yamaguchi T, Tago Y, Kitano M, Hayashi SM, Wanibuchi H.	Chronic dietary toxicity and carcinogenicity studies of dammar resin in F344 rats.	Arch Toxicol	92	3565-83	2018
<u>Gi M</u> , Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S	In vivo positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats.	Arch Toxicol	92	3207-21	2018
Fukushima S, <u>Gi M</u> , Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Matsumoto M	Quantitative Approaches to Assess Key Carcinogenic Events of Genotoxic Carcinogens	Toxicol Res	34	291-6	2018
Shimizu Y, Tamada S, Kato M, Takeyama Y, Fujioka M, Kakehashi A, Nakatani T, Wanibuchi H, <u>Gi M</u>	Steroid sulfatase promotes invasion through epithelial-mesenchymal transition and predicts the progression of bladder cancer	Exp Ther Med	16	4463-70	2018
Oikawa D, Shiota M, Tokunaga F, Wanibuchi H	Generation of Rat Monoclonal Antibodies Specific for DZIP3	Monoclon Antib Immunodiagn Immunother	37	153-7	2018

Oikawa D, Shiota M, Goto E, Komakura K, Wanibuchi H, Tokunaga F	Generation of Rat Monoclonal Antibodies Against a Deubiquitinase, Ovarian Tumor Domain-Containing Protein 1	Monoclon Antib Immunodiagn Immunother	37	180-4	2018
Kitajima S, Lee KL, Fujioka M, Sun W, You J, Chia GS, Wanibuchi H, Tomita S, Araki M, Kato H, Poellinger L	Hypoxia-inducible factor-2 alpha up-regulates CD70 under hypoxia and enhances anchorage-independent growth and aggressiveness in cancer cells	Oncotarget	9	19123-35	2018
Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K.	A 13-week subchronic toxicity study of acetaminophen using an obese rat model	J Toxicol Sci	43	423-33	2018
Tanoue Y, Toyoda T, Sun J, Mustofa MK, Tateishi C, Endo S, Motoyama N, Araki K, Wu D, Okuno Y, Tsukamoto T, Takeya M, Ihn H, Vaziri C, Tateishi S	Differential roles of Rad18 and Chk2 in genome maintenance and skin carcinogenesis following UV exposure	J Invest Dermatol	138	2550-7	2018
Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Takahashi M, Inoue K, Ogawa K	A 13-week subchronic toxicity study of 2-ethylbutanal in F344 rats	Regul Toxicol Pharmacol	100	118-26	2018
Akagi J, Cho YM, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K	Subchronic toxicity evaluation of 5-hexenyl isothiocyanate, a nature identical flavoring substance from <i>Wasabia japonica</i> , in F344/DuCrj rats	Food Chem Toxicol	122	80-6	2018

Furihata C, Toyoda T, Ogawa K, Suzuki T.	Using RNA-Seq with 11 marker genes to evaluate 1,4-dioxane compared with typical genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens	Mut Res	834	51-5	2018
Ito, Y, Naiki-Ito, A, Kato, H, Suzuki, S, Kuno, T, Ishiguro, Y, Takahashi, S, Uemura, H	Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by down-regulation of androgen receptor.	Oncotarget	9	13859-13869	2018
Suzuki, S, Cohen, SM, Arnold, L, Kato, H, Fujita, S, Pennington, KL, Nagayasu, Y, Naiki-Ito, A, Yamashita, Y, Takahashi, S	Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis.	Toxicology	398-399	31-40	2018
Naiki, T, Naiki-Ito, A, Iida, K, Etani, T, Kato, H, Suzuki, S, Yamashita, Y, Kawaguchi, N, Yasui, T, Takahashi, S	GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis.	Oncotarget	9	15847-15859	2018
Hayashi, Y, Nishiyama, T, Nakatani, M, Suzuki, S, Takahashi, S, Sugiura-Ogasawara, M	Association of genetic variants of PD1 with recurrent pregnancy loss.	Reprod Med Biol	17	195-202	2018
Takeshita, S, Yamashita, Y, Shimizu, K, Suzuki, N, Yoshida, J, Naiki-Ito, A, Suzuki, S, Akatsuka, S, Toyokuni, S, Takahashi, T, Mase, S, Arakawa, A, Sugiura-Ogasawara, M, Takahashi, S	Expression of P-REX2a is associated with poor prognosis in endometrial malignancies.	Oncotarget	9	24778-24786	2018
Suzuki, S, Kato, H, Fuji, S, Naiki, T, Naiki-Ito, A, Yamashita, Y, Takahashi, S	Early detection of prostate carcinogens by immunohistochemistry of HMGB2.	J Toxicol Sci	43	359-367	2018

Kuno, T, Kato, H, Naiki-Ito, A, Suzuki, S, Tanaka, T, Takahashi, S, Mori, H	Preventive effects of fermented brown rice and rice bran on spontaneous lymphomagenesis in AKR/NS1c female mice.	Asian Pac J Cancer Prev	19	3217-3223	2018
Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Hashimoto N, Kanie S, Yoshida S, Imaida K.	Characteristics of surfactant proteins in tumorigenic and inflammatory lung lesions in rodents.	J Toxicol Pathol	31	231-240	2018
Fukai, E, Sato, H, Watanabe, M, Nakae, D, Totsuka, Y	Establishment of an in vivo simulating coculture 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.	-H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two nonharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline.	Journal of Applied Toxicology	38	537-543	2018
Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K	A 13-week subchronic toxicity study of acetaminophen using an obese rat model	J Toxicol Sci	43	423-33	2018
Yokohira M, Nakano-Narusawa Y, Yamakawa K, Hashimoto N, Yoshida S, Kanie S, Imaida K.	Validating the use of napsin A as a marker for identifying tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in rodents.	Exp Toxicol Pathol	69	637-42	2017
Kanie S, Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Yoshida S, Hashimoto N, Imaida K	Suppressive effects of the expectorant drug ambroxol hydrochloride on quartz-induced lung inflammation in F344 rats	J Toxicol Pathol	30(2)	153-9	2017

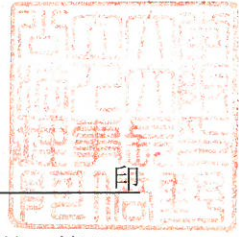
平成31年4月10日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人大阪

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 西澤 良記



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 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 大阪市立大学大学院医学研究科・教授  
(氏名・フリガナ) 鰐淵 英機 (ワニブチ ヒデキ)

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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	大阪市立大学	<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4月10日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人大阪

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 西澤 良記



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 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大阪市立大学大学院医学研究科・准教授  
(氏名・フリガナ) 魏 民 (ギ ミン)

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"/>	大阪市立大学	<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: )
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。

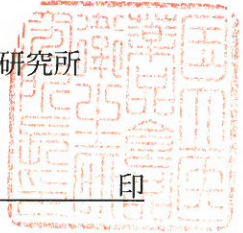
平成31年3月28日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

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 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 病理部 室長

(氏名・フリガナ) 豊田 武士 (トヨダ タケシ)

#### 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。



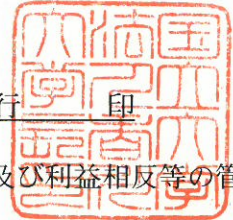
平成31年 2月25日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立大学法人香川大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 寛 善行



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 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 香川大学医学部腫瘍病理学・准教授  
(氏名・フリガナ) 横平 政直 (ヨコヒラ マサナオ)

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"/>	香川大学動物実験委員会	<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: )
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。

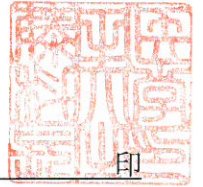
2019 年 5 月 8 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 藤田医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 才藤 栄一



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 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 医学部病理診断科・教授

(氏名・フリガナ) 塚本徹哉 (ツカモト テツヤ)

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"/>	DIMS 医科学研究所	<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: 申請中)
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。



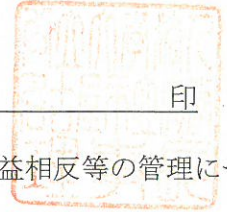
年 月 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人名古屋市立大学

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 郡 健二郎 印



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 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究 (H29-化学-一般-001)
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医学研究科・講師  
(氏名・フリガナ) 鈴木 周五 ・ スズキ シュウゴ

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"/>	名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センター動物実験委員会	<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: )
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。

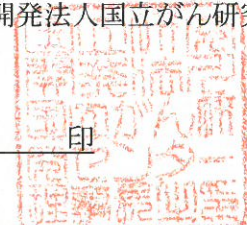
2019年 4月 1日

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 齊 印



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 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究
- 3. 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 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。