

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

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

(H30-食品-一般-003)

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

令和2年（2020） 5月

目 次

I. 総括研究報告書（別添 3）	
香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究	1
国立医薬品食品衛生研究所 副所長 本間 正充	
II. 分担研究報告書（別添 4）	
QSAR と Ames 試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究	1 5
国立医薬品食品衛生研究所 副所長 本間 正充	
QSAR 試験、Ames 試験、哺乳類細胞を用いる遺伝子変異試験から得られる変異原性の比較	3 0
国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 安井 学	
AOP と定量的評価を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化	3 8
国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 増村 健一	
Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法による評価	4 5
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 石井 雄二、高須 伸二、西川 秋佳、小川 久美子	
肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価	5 4
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 高須 伸二、石井 雄二、西川 秋佳、小川 久美子	
オルガノイドの調製、オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備	6 1
国立がん研究センター・研究所 今井 俊夫	
オルガノイドの調製	7 0
国立がん研究センター・研究所 落合 雅子	
オルガノイドを用いる遺伝毒性試験の技術整備	7 3
国立がん研究センター研究所 発がん・予防研究分野 戸塚ゆ加里	
オルガノイドを用いる遺伝毒性試験の技術整備	7 6
静岡県立大学 食品栄養科学部 三好 規之	
オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備、動物モデルにおける腫瘍性病変発臓器における発がん性評価	8 0
千葉県がんセンター・研究所 筆宝 義隆	
オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備	8 3
岐阜大学 研究推進・社会連携機構 平田 暁大	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添 5）	8 9

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

研究代表者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

研究要旨

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

I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

QSAR による予測が困難であったフラン類、チオエーテル類、チオール類について Ames 試験を実施し、新たな Ames 試験結果を加えた新規香料エームス試験データベース（490 化合物）を完成させた。本データベースは香料の変異原性の予測に特化したローカル QSAR モデルの開発に有用であると考えられる。Ames 試験結果が QSAR 結果と異なる 3 物質について、ヒト培養細胞を用いたチミジンキナーゼ遺伝子 (*TK*) 変異試験を実施した。DNA 初期損傷と遺伝子突然変異の量的相関を明らかにするため、*gpt delta* マウスを用いたアクリルアミドの飲水投与実験を実施した結果、投与群の肝臓で *gpt* 突然変異体頻度は有意に増加したが用量依存性は明確でなかった。香料の安全性評価における一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験の有用性を検討するため *acetamide* の包括的評価を実施した。F344 *gpt delta* ラットに *acetamide* を 13 週間混餌投与した結果、無毒性量は 0.625%（394 mg/kg 体重/日に相当）であった。肝臓において *gpt* および *Spi* 変異体頻度の変化は認められず、*acetamide* の肝発がん突然変異誘発性の関与は乏しいことが明らかになった。また、3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質として遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験を実施するための用量設定試験を実施した。F344 ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 28 日間投与した結果、最高用量 540 mg/kg/day 投与群では顕著な体重増加抑制が認められたことから、本試験の最高用量を 300 mg/kg/day に設定した。

II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究

オルガノイドは常温輸送が可能であることを確認し、遺伝毒性については、陽性対照物質の濃度に対応した *gpt* 遺伝子の変異頻度上昇傾向を認めた。発がん性についてはマウス系統差を検討し、陽性対照物質への感受性が *rasH2* マウス由来オルガノイドに比し *Trp53* ヘテロノックアウトマウスあるいは *LSL-Kras^{G12D}* マウス由来オルガノイドで高いことが示された。動物モデルで低感受性の胃発がんについては、*Pik3ca* 活性化変異と *Trp53* 欠失の組合せによるオルガノイドの造腫瘍性を確認した。

研究分担者

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

A. 研究目的

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

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

本研究班は上記の目的を達成するため、以下の研究に取り組んだ。

I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

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

QSAR 予測が困難と考えられるフラン類、チオエーテル類、チオール類について Ames 試験を実施し、予測のためのケミカルスペースの拡大を行う。また、これまで報告されてきた香料の Ames 試験データベースを精査し、また最近実施された Ames 試験結果をデータベースに取り込むことにより、データベースの拡大と堅牢化をおこなうことを目的とする。

2) QSAR 試験、Ames 試験、哺乳類細胞を用いる遺伝子変異試験から得られる変異原性の比較 (安井) :

Derek Nexus と Case Ultra モデルの QSAR 結果が互いに異なる、或いは実際の Ames 試験結果がそれらの QSAR 結果と異なる 3 物質について、上位試験であるヒト培養細胞を用いるチミジンキナーゼ遺伝子 (TK) 変異試験を実施することによって、*in silico* の QSAR と細菌を用いる Ames 試験の両結果と比較し、TK 変異試験の有用性を明らかにすることを目的とする。

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

OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法 (AOP)」を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。分子的初期イベントである DNA 初期損傷 (DNA 付加

体形成)とこれに続くキーイベントである遺伝子突然変異誘発に関して、*in vivo*における量的相関を明らかにする。既存の *gpt delta* ラット試験系のコストが高い欠点を改善するため、レポーター遺伝子の回収効率を高めた新規 *gpt delta* ラットの作出と評価を行う。

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

本研究では、香料の迅速かつ包括的な安全性評価のため、これまでに構築したレポーター遺伝子導入動物 *gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験の有用性を検討する。食品香料として用いられていた acetamide はラット肝発がん性を有するが、その機序は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、*gpt delta* ラットを用いた acetamide の包括的評価を実施した。平成 30 年度は用量設定試験の後、本試験として雄性 6 週令の *gpt delta* ラットに acetamide を 0.625, 1.25 および 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与し、血液学的検査および血清生化学検査を実施した。本年度は、全身諸臓器の病理組織学的検査と遺伝毒性評価を実施した。

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

食品香料化学物質の安全性を *in silico*, *in vitro*, *in vivo* で階層的に評価する評価系を構築することを目的に、*in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物を対象として、*in vivo* での遺伝毒性・発がん性を検討する。*in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物としてリストアップされた 10 候補化合物のうち、げっ歯類において肝発がん性を示すことが知られるフラン環を基本骨格とする香気成分である 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質として、今年度は遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験を実施するための用量設定試験を実施した。

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

我々はこれまでに、レポーター遺伝子導入マウスから 3 次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質の検出が可能で、がん関連遺伝子改変マウスの正常組織から調製したオルガノイド系につき、既知の発がん物質が造腫瘍性あるいは上皮細胞の重層化/異型性/浸潤性を指標とする腫瘍化を示す変化を誘導することを見出した。本研究では、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法としての条件設定を行い、多施設で実施可能な標準法の確立を目指す。更に、従来動物モデルでは腫瘍性病変が発生しづらい胃由来のオルガノイドに対する化学物質の反応性解析法の確立を目的とし技術基盤を構築する。

B. 研究方法

I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

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

以下のフラン化合物①、チオエーテル②、チオール化合物③の Ames 試験を実施した。

- ① 4,5-Dihydro-2,5-dimethyl-4-oxofuran-3-yl butyrate (Cas# 114099-96-6)
- ② 2,4,4-trimethyl-1,3-oxathiane (Cas# 72472-02-7)
- ③ 2-methyl-2-butanethiol (Cas# 1679-09-0)

2) QSAR 試験、Ames 試験、哺乳類細胞を用いる遺伝子変異試験から得られる変異原性の比較 (安井) :

以下の 3 種のフラン化合物の TK 変異試験を実施した。TK 変異試験は、OECD ガイドライン (TG490) に従って行った。使用する被験物質は、非代謝活性化条件下において Ames 試験陽性になるため、代謝活性化条件下の試験は行わなかった。

- ① 3-Acetyl-2,5-dimethylfuran (Cas; 10599-70-9)
- ② 4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Cas; 4166-20-5)
- ③ 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone (Cas; 4077-47-8)

3) AOP と定量的評価を取り入れた遺伝毒性発が

んリスク評価法の精緻化 (増村) :

雄 *gpt delta* マウスに AA を 300, 100, 30 ppm の用量で 28 日間飲水投与し、最終投与 3 日後と 100 日後に組織を採取した。肝臓の *gpt* 遺伝子突然変異体頻度を測定し用量反応データを得た。 λ EG10 DNA をゲノムに導入したトランスジェニックラットを作成し、 λ EG10 をホモに持った新規 *gpt delta* ラット (Wistar Hannover 系) の候補ラインについて、肝臓 DNA を抽出してレポーター遺伝子の回収効率を測定した。

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

Acetamide を 0.625, 1.25 および 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与した 6 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラットについて、全身諸臓器の病理組織学的検索と発がん標的臓器である肝臓について *gpt* assay および Spi assay による変異原性評価を実施した。

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

6 週齢の雄性 F344 ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 60, 180 又は 540 mg/kg の濃度で 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。投与終了後、イソフルラン麻酔下で採血後、血清生化学的検査を実施した。剖検時に肝臓、腎臓、脾臓、肺、消化管および鼻腔を摘出し、肝臓、腎臓、脾臓及び肺に関しては、重量の測定を行った。さらに、摘出した臓器・組織について病理組織学的検査を実施した。

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

遺伝毒性については *gpt delta* マウス由来の肺オルガノイドに対し、低濃度・高濃度のアクリルアミド (AA) で処置した。発がん性については *rasH2* と *non-Tg* マウス由来の肺および肝臓 (胆管) からオルガノイドを調製し、メタンスルホン酸エチル (EMS)、アクリルアミド (AA) およびジエチルニトロソアミン (DEN)、陰性対照と

して安息香酸ナトリウム (SB) の低・高濃度で処置し、ヌードマウス皮下に移植して評価した。オルガノイドは、基幹機関で調製したものを常温で各分担機関に送付した。胃については、*Pik3ca* 活性化変異/*Trp53* 欠失、*Apc* 欠失/*Trp53* 欠失などの影響を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、各研究施設の規定に従って動物実験倫理委員会の承認を得た後に実施し、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認を得た後に実施した。

C. 研究結果

I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

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

フラン化合物①は陽性、チオエーテル化合物②、チオール化合物③は陰性を示した。既存の香料データベース (367 化合物) を再評価し、試験結果に疑義がある 7 化合物の Ames 変異原性結果を確定した。また、新規の Ames 試験結果を取り込んだ 490 化合物からなる香料 Ames 試験データベースを作成した。

2) QSAR 試験、Ames 試験、哺乳類細胞を用いる遺伝子変異試験から得られる変異原性の比較 (安井) :

TK 変異試験は、Ames 試験と QSAR 試験の陽性物質 (3-Acetyl-2,5-dimethylfuran) に対して陽性と判定した。また、TK 変異試験は、Ames 試験と QSAR 試験 (Case Ultra) の陰性物質 (2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone) に対して陰性と判定した。4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone の結果は、統計解析では陽性だが、TK 変異頻度データを詳細にみると未処理群の変異頻度が背景データよ

りも低いことと用量依存性が無かったことから総合的判断として陰性と判定した。

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

AA 投与群の肝臓における *gpt* 突然変異体頻度は陰性対照群と比較して有意に増加した。変異体頻度は 30 ppm 群で有意に増加したが高用量では頭打ちとなる用量反応曲線を示した。新規 *gpt delta* ラット候補ラインのレポーター遺伝子回収効率を測定した。 λ EG10 遺伝子のゲノムへの導入が PCR で確認された個体から交配によって導入遺伝子をホモに持つ系統を作出し、候補 2 系統について、肝臓 DNA を用いて *in vitro* パッケージングを行った。既存の *gpt delta* ラットと比較して、ライン 1 では約 3 倍、ライン 2 では約 5 倍高い回収効率を得られた。

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

全身諸臓器の病理組織学的検査の結果、肝臓では 1.25% から肝細胞の空胞化、有糸分裂像の増加、単細胞壊死、好塩基性の細胞質内封入体、核の大小不同、オーバルセル過形成及び変異肝細胞巢が認められた。脾臓では、2.5% において赤芽球の減少が認められた。また、種々の臓器で病理所見が散見されたが、いずれも統計学的に有意ではなく、自然発生性の変化と考えられた。遺伝毒性評価の結果、いずれの投与群においても *gpt* 及び *Spi* 変異体頻度の有意な変化は認められなかった。また、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラム解析においても、acetamide に投与による変異パターンの変化は認められなかった。

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

540 mg/kg/day 投与群の全例で投与 1 週目から鼻出血及び紅涙が認められたが、症状は投与 3 週目以降には観察されなかった。540 mg/kg/day 投与群において、投与 1 週目から投与終了時まで統計学的に有意な体重増加抑制が認められた。臓器重量測定の結果、540 mg/kg/day 投与群の肝臓、

腎臓、肺及び脾臓の相対重量は統計学的に有意な高値を示した。血清生化学的検査の結果、60 mg/kg/day 以上の投与群において、アルブミン/グロブリン比の上昇、グルコース、トリグリセリド、BUN 及びクレアチニンの低下が認められた。病理組織学的検査の結果、540 mg/kg/day 投与群の全例において鼻腔嗅上皮の壊死が認められた。

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

遺伝毒性については、AA の濃度に対応して *gpt* 遺伝子の変異頻度が上昇する傾向がみられた。発がん性については、*rasH2* マウス由来肺および肝臓 (胆管) オルガノイドの EMS 高濃度処置群、肺オルガノイドの AA 高濃度処置群で発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性が 1/4~2/4 の頻度でみられたが有意差はなかった。肺オルガノイドに対する AA の影響として、ヌードマウスに移植する前のオルガノイドに形態変化が確認できる可能性が示された。以上、オルガノイドは常温輸送が可能なことを確認し、各研究分担者にて実験を進めた。胃オルガノイドでは *Pik3ca* 活性化変異と *Trp53* 欠失の組合せで強い造腫瘍性が、*Apc* 欠失と *Trp53* 欠失の組合せで弱いながら発がん作用がみられた。

D. 考 察

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

香料 Ames 試験データベースを作成した。本データベースは信頼性が高く、香料の変異原性の予測に特化したローカル QSAR モデルの開発に有用であると考えられる。

TK 変異試験は、精度が良く信頼性の高い試験であること、そして QSAR 試験の Case Ultra モデルの結果と最も一致することが分かった。

AA 投与マウスの肝臓において DNA 付加体量が投与量に依存して増加するのに対して、遺伝子突然変異の頻度は高用量域で頭打ちの用量反応性を示すことが示唆された。遺伝毒性発がん AOP

において、分子的初期イベント（DNA 付加体形成）と下流のキーイベント（遺伝子突然変異誘発）が定性的に相関する一方で、異なる用量反応性を示す場合があることが示唆された。新規の λ EG10 ホモ化 *gpt delta* ラットは既存のヘテロ F344 系統と比較してレポーター遺伝子回収効率が高く TGR 試験の効率化が期待できる。

acetamide の包括的評価においては、血清生化学検査の肝毒性パラメーターとともに、肝臓では 1.25% から肝傷害性の変化が観察され、2.5% ではそれらの程度及び頻度が増加した。核成分に由来する細胞質内封入体も 1.25% から認められ、同群では有糸分裂像の増加および核の大小不同が認められたことから、有糸分裂異常に関連した変化と考えられた。脾臓で認められた赤芽球の減少は、血液学的検査における赤血球系パラメーターの変動に関連した変化と考えられた。なお、0.625% においてこれらの変化は認められなかったことから、本試験における無毒性量は 0.625% (394 mg/kg 体重/日に相当) と考えられた。また、遺伝毒性評価の結果、*acetamide* のラット肝発がんにおける突然変異誘発性の関与は乏しいと考えられた。

3-acetyl-2,5-dimethylfuran については、540 mg/kg/day 投与群では有意な体重増加抑制が認められ、投与終了時では対照群に比して約 30% 減少したことから、この用量では投与を継続できないと判断し、本試験の最高用量は 300 mg/kg/day に設定した。また、540 mg/kg/day 投与群の全例で鼻出血が認められ、病理組織学的検査で鼻腔上皮の壊死が認められたことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran は、高用量では鼻腔粘膜を毒性標的とする可能性が示唆された。一方、血清生化学的検査の結果、複数の検査項目で統計学的に有意な変化が認められたが、鼻腔粘膜以外の臓器で毒性影響を示す病理組織学的変化がみられなかったことから、より長期間の試験での毒性影響を検討する必要があると考えられた。

II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する

研究（今井、落合、戸塚、三好、筆宝、平田）

gpt delta マウス由来のオルガノイドを用いる遺伝毒性試験法については、臓器毎、更に変異パターンについてもマウスを用いた既報との比較解析を継続する。マウスオルガノイド系を用いる発がん性試験法としての条件設定に関して、平成 30 年度の結果との統合評価により被験物質によるマウス系統差があることが示され、幅広い被験物質に感受性を示すマウス系統の選択を継続する必要がある。また、ヌードマウスに移植する前のオルガノイドの形態変化をエンドポイントとした発がん性評価の可能性を示した。来年度は引き続き、従来の動物モデルでは検出が難しいとされる胃発がんなどを含めて遺伝毒性・発がん性が検出可能な短中期試験法としての検討を継続する。

E. 結論

I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

QSAR による予測が困難であったフラン類、チオエーテル類、チオール類について Ames 試験を実施し、新たな Ames 試験結果を加えた新規香料エームス試験データベース（490 化合物）を完成させた。本データベースは香料の変異原性の予測に特化したローカル QSAR モデルの開発に有用であると考えられる。Ames 試験結果が QSAR 結果と異なる 3 物質について、ヒト培養細胞を用いたチミジンキナーゼ遺伝子 (*TK*) 変異試験を実施した。得られたデータは、QSAR 予測性の向上、および専門家判断のための重要な遺伝毒性評価データとして資すると考えられる。DNA 初期損傷と遺伝子突然変異の量的相関を明らかにするため、*gpt delta* マウスを用いたアクリルアミドの飲水投与実験を実施した結果、投与群の肝臓で *gpt* 突然変異体頻度は有意に増加したが用量依存性は明確でなかった。レポーター遺伝子の回収効率が低い新規 *gpt delta* ラット系統は TGR 試験の効率化に寄与すると考えられた。F344 *gpt delta* ラットに *acetamide* を 13 週間混餌投与した結果、無毒性量は 0.625% (394 mg/kg 体重/日に相当) であった。肝臓において *gpt* および *Spi* 変異体頻

度の変化は認められず、acetamide の肝発がんは突然変異誘発性の関与は乏しいことが明らかになった。また、3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質として遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験を実施するための用量設定試験を実施し、本試験の最高用量を 300 mg/kg/day に設定した。

II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究

オルガノイドは常温輸送が可能なことを確認し、遺伝毒性については、陽性対照物質の濃度に対応した *gpt* 遺伝子の変異頻度上昇傾向を認めた。発がん性についてはマウス系統差を検討し、陽性対照物質への感受性が *rasH2* マウス由来オルガノイドに比し *Trp53* ヘテロノックアウトマウスあるいは *LSL-KrasG12D* マウス由来オルガノイドで高いことが示された。動物モデルで低感受性の胃発がんについては、*Pik3ca* 活性化変異と *Trp53* 欠失の組合せによるオルガノイドの造腫瘍性を確認した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

1. 本間正充；医薬品中の変異原性不純物の安全性評価と管理—ICH-M7を踏まえた遺伝毒性物質の許容値の設定に関する科学—
PHARM TECH JAPAN 35(8), 1461-1469, 2019.
2. 本間正充；食品中に混在する微量な化学物質の安全性評価 一定量の構造活性相関 (QSAR) による変異原性化学物質の同定—
日本包装学会誌 29 (1), 27-42, 2020
3. 本間正充；化学物質の遺伝毒性評価と定量的構造相関 ((Q) SAR) ポリ衛協会報 65, 5-25, 2019
4. 本間正充；毒性試験の未来を考える — (定量的) 構造活性相関による化学物質の変異原

性評価 — 国立医薬品食品衛生研究所報告 137, 20-31, 2019

5. Hasselgren C, Ahlberg E, Akahori Y, Amberg A, Anger LT, Atienzar F, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cronin MTD, Crooks I, Cross KP, Custer L, Dobo K, Doktorova T, Faulkner D, Ford KA, Fortin MC, Frericks M, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Barton-Maclaren TS, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Masten S, Miller S, Moudgal C, Muster W, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Schilter B, Snyder RD, Stavitskaya L, Stidl R, Szabo DT, Teasdale A, Tice RR, Trejo-Martin A, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Myatt GJ. Genetic toxicology in silico protocol. Regul Toxicol Pharmacol. 2019 Oct; 107:104403. doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104403. Epub 2019 Jun 11. PubMed PMID: 31195068.
6. Petko I, Petkov, Chanita Kuseva, Stefan Kotov, Masamitsu Honma, Airi Kitazawa, Sunil Kulkarni, Terry W. Schultz, Ovanes G. Mekenyan. Procedure for toxicological predictions based on mechanistic weight of evidences: Application to Ames mutagenicity. Computational Toxicology 12, 2019; doi.org/10.1016/J.COMTOX.2017.02.004.
7. Sassa A, Fukuda T, Ukai A, Nakamura M, Takabe M, Takamura-Enya T, Honma M, Yasui M. Comparative study of cytotoxic effects induced

- by environmental genotoxins using XPC- and CSB-deficient human lymphoblastoid TK6 cells. *Genes Environ.* 41 :15 (2019). doi: 10.1186/s41021-019-0130-y.
8. Aoki Y, Matsumoto M, Matsumoto M, Masumura K, Nohmi T. Mutant frequency is not increased in mice orally exposed to sodium dichromate. *Food Safety.* 2019;7:2–10.
 9. Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline in F344 *gpt* delta transgenic rats. *Mutagenesis.* 2019;34:279-287.
 10. Lynch AM, Eastmond D, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Marchetti F, Masumura K, Pacchierotti F, Schuler M, Tweats D. Targets and mechanisms of chemically induced aneuploidy. Part 1 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res.* 2019;847:403025.
 11. Pacchierotti F, Masumura K, Eastmond D, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Lynch AM, Schuler M, Tweats D, Marchetti F. Chemically induced aneuploidy in germ cells. Part II of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res.* 2019 Nov;848:403023.
 12. T Tweats D, Eastmond DA, Lynch AM, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Marchetti F, Masumura K, Pacchierotti F, Schuler M. Role of aneuploidy in the carcinogenic process: Part 3 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res.* 2019;847:403032.
 13. Hori H, Shimoyoshi S, Tanaka S, Momonami A, Masumura K, Yamada M, Fujii W, Kitagawa Y, Hayashi M. Multiple-endpoint genotoxicity assay for colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Mutat Res.* 2020;849:503130.
 14. Aoki Y, Taniguchi Y, Matsumoto M, Matsumoto M, Ohno M, Masumura K, Sasaki S, Tsuzuki T, Yamamoto M, Nohmi T. Oxidative-stress-driven in vivo mutagenesis induced by oral administration of potassium bromate in the small intestines of *gpt* delta mice. *Mutat Res.* 2020;850-851:503136.
 15. Machida, Y., Sudo, Y., Uchiya, N., Imai, T.: Increased susceptibility to mammary carcinogenesis and an opposite trend in endometrium in *Trp53* heterozygous knockout female mice by back-crossing the BALB/c strain onto the background C3H strain. *J. Toxicol. Pathol.* 32, 197-203 (2019)
 16. Matsuura, T., Maru, Y., Izumiya, M., Hoshi, D., Kato, S., Ochiai, M., Hori, M., Yamamoto, S., Tasuno, K., Imai, T., Aburatani, H., Nakajima, A., Hippo, Y.: Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis* doi: 10.1093/carcin/bgz122 (2019)
 17. Moro, H., Hattori, N., Nakamura, Y., Kimura, K., Imai, T., Maeda, M., Yashiro, M., Ushijima, T. Epigenetic priming sensitizes gastric cancer cells to irinotecan and cisplatin by restoring multiple pathways. *Gastric Cancer* 23, 116-117

- (2020)
18. Naruse, M., Masui, R., Ochiai, M., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T. An organoid-based carcinogenesis model induced by *in vitro* chemical treatment. *Carcinogenesis* doi: 10.1093/carcin/bgaa011 (In press)
 19. Ochiai M, Yoshihara Y, Maru Y, Matsuura T, Izumiya M, Imai T, Hippo Y. Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis*. 40:1142-1152. doi: 10.1093/carcin/bgz024 (2019)
 20. Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl- β -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review., *Mutation Res*, 2020, Feb - Mar;850-851:503148.
 21. Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL. High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Res*. 2019 Nov;847:403022.
 22. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Ishino K, Sato H, Kato M, Nagai M, Elzawahry A, Totoki Y, Nakamura H, Hosoda F, Shibata T, Matsuda T, Matsushima Y, Song G, Meng F, Li D, Liu J, Qiao Y, Wei W, Inoue M, Kikuchi S, Nakagama H, Shan B. DNA Adductome Analysis Identifies N-Nitrosopiperidine Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China. *Chem Res Toxicol*. 2019 Aug 19; 32 (8): 1515-1527.
 23. Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis*. 2019 Jun 20. doi: 10.1093/carcin/bgz120
 24. Sanada S, Suzuki T, Nagata A, Hashidume T, Yoshikawa Y, Miyoshi N. Intestinal microbial metabolite stercobilin involvement in the chronic inflammation of *ob/ob* mice. *Sci. Rep.*, (2020) 10, 6479.
 25. Shimba Y, Katayama K, Miyoshi N, Ikeda M, Morita A, Miura S. β -aminoisobutyric acid suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Biol. Pharm. Bull.*, (2020) in press
 26. Matsuzaki K, Iwai K, Yoshikawa Y, Shimamura Y, Miyoshi N, Hiramoto S, Asada K, Fukutomi R, Su H, Ohashi N. Wheat bran intake enhances to secrete bacteria-binding IgA into a lumen of the intestinal tract by the increment of short chain fatty acid production through the modulation of gut microbiota. *Nat. Prod. Commun.* (2020) in press
 27. Uchikawa M, Kato M, Nagata A, Sanada S, Yoshikawa Y, Tsunematsu Y, Sato M, Suzuki T, Hashidume T, Watanabe K, Yoshikawa Y, Miyoshi N. Elevated levels of proinflammatory volatile metabolites in feces of high fat diet fed KK-*A^y* mice. *Sci. Rep.*, (2020) 10, 5681.
 28. Kawanishi M, Shimohara C, Oda Y, Hisatomi Y, Tsunematsu Y, Sato M, Hirayama Y, Miyoshi N, Iwashita Y, Yoshikawa Y, Sugimura H, Mutoh M, Ishikawa H, Wakabayashi K, Yagi T, Watanabe K. Genotyping of a gene cluster

- for production of colibactin and in vitro genotoxicity analysis of *Escherichia coli* strains obtained from the Japan Collection of Microorganisms. *Genes and Environment*, (2020) 42, 11.
29. Sarmales-Murga C, Akaoka F, Sato M, Takanishi J, Mino T, Miyoshi N, Watanabe K. Novel class of dimeric product isolated from the fungus *Chaetomium globosum*: Evaluation of chemical structure and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*, (2020) 73, 320-323.
 30. Kondo T, Saigo S, Ugawa S, Kato M, Yoshikawa Y, Miyoshi N, Tanabe K. Prebiotic effect of fructooligosaccharides on the inner ear of DBA/2J mice with early-onset progressive hearing loss. *J Nutr Biochem.*, (2020) 75, 108247.
 31. Kawanishi M, Hisatomi Y, Oda Y, Shimohara C, Tsunematsu Y, Sato M, Hirayama Y, Miyoshi N, Iwashita Y, Yoshikawa Y, Sugimura H, Mutoh M, Ishikawa H, Wakabayashi K, Yagi T, Watanabe K. In vitro genotoxicity analyses of colibactin-producing *E. coli* isolated from a Japanese colorectal cancer patient. *J Toxicol Sci.*, (2019) 44, 871-876.
 32. Hirayama Y, Tsunematsu Y, Yoshikawa Y, Tamafune R, Matsuzaki N, Iwashita Y, Ohnishi I, Tanioka F, Sato M, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K. Activity-based probe for screening of high-colibactin producers from clinical samples. *Org Lett.*, (2019) 21, 4490-4494.
 33. Shimba Y, Togawa H, Senoo N, Ikeda M, Miyoshi N, Morita A, Miura S. Skeletal muscle-specific PGC-1 α overexpression suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Sci. Rep.*, (2019) 9, 4077.
 34. Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with o-toluidine and o-anisidine. *Arch. of Toxicol.*, (2019) 93, 753-764.
 35. Maru Y, Kawata A, Taguchi A, Ishii Y, Baba S, Mori M, Nagamatsu T, Oda K, Kukimoto I, Osuga Y, Fujii T, Hippo Y. Establishment and molecular phenotyping of organoids from the squamocolumnar junction region of the uterine cervix. *Cancers*. 12(3), 694. doi.org/10.3390/cancers12030694. 2020
 36. Maru Y, Tanaka N, Ebisawa K, Odaka A, Sugiyama T, Itami M, Hippo Y. Establishment and characterization of patient-derived organoids from a young patient with cervical clear cell carcinoma. *Cancer Sci.* 110 (9); 2992-3005. 2019
 37. Maru Y, Hippo Y. Current status of patient-derived ovarian cancer models. *Cells*. 8(5). pii: E505. doi: 10.3390/cells8050505. 2019
 38. Maru Y, Tanaka N, Itami M, Hippo Y. Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors. *Gynecol. Oncology*. 154(1): 189-198, 2019 doi: 10.1016/j.ygyno.2019.05.005
 39. Maru Y, Onuma K, Ochiai M, Imai T, Hippo Y. Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoid. *Cancer Sci.* 110: 858-866, 2019
 40. Hirata A, Hatano Y, Niwa M, Hara A, and Tomita H. Heterogeneity in Colorectal Cancer Stem Cells. *Cancer Prev. Res.* 12(7), 413-420, 2019.

41. Hirata A, Miyamoto Y, Kaneko A, Sakai H, Yoshizaki K, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, and Suzuki J. Hepatic Neuroendocrine Carcinoma in a Japanese Macaques (*Macaca fuscata*). *J. Med. Primatol.*, 48(2), 137-40, 2019.
42. Hirata A, Kaneko A, Sakai H, Nakamura S, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, Suzuki J. T-cell/Histiocyte-rich Large B-cell Lymphoma of the Larynx in a Juvenile Japanese Macaque (*Macaca fuscata*). *J. Comp. Pathol.* 169, 1-4, 2019
43. Kanayama T, Tomita H, Binh NH, Hatano Y, Aoki H, Okada H, Hirata A, Fujihara Y, Kunisada T, and Hara A. Characterization of a BAC transgenic mouse expressing *Krt19*-driven iCre recombinase in its digestive organs. *PLoS One* 14(8):e0220818. 2019
44. Goto M, Hirata A, Murakami M, and Sakai H. Trimer of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand induces apoptosis in canine mammary tumor cells. *J. Vet. Med. Sci.* 81(12), 1791-1803, 2019
45. Arioka Y, Hirata A, Kushima I, Aleksic B, Mori D, Ozaki N. Characterization of a schizophrenia patient with a rare *RELN* deletion by combining genomic and patient-derived cell analyses. *Schizophrenia Res. in press.*
46. Nakashima T, Kato K, Hatano Y, Hirata A, Okada H, Shibata T, Hara A. Specific deletion of p16^{INK4a} with retention of p19^{ARF} enhances the development of invasive oral squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol. in press.*
47. Tashita C, Hoshi M, Hirata A, Kubo H, Nakamoto K, Hattori T, Yamamoto Y, Tomita H, Hara A, and Saito K. Kynurenine Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate-Induced Colitis in Mice. *World J. Gastroenterol.* 26(9):918-932. 2020
48. Kurihara T, Hirata A, Yamaguchi T, Okada H, Kameda M, Sakai H, Haridy M, Yanai T. Avipoxvirus infection in two captive Japanese cormorants (*Phalacrocorax capillatus*). *J. Vet. Med. Sci. in press.*

学会発表

1. Honma M., Improvement of Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) Tools for Predicting Ames Mutagenicity. 第 47 回欧州環境変異ゲノム学会 2019 年 19-23 日、フランス、レンヌ
2. 本間正充; ICH-M7(医薬品中の DNA 反応性不純物の評価と管理)に関するガイドライン、第 74 回 MMS 研究会定例会、6 月 14 日、京都
3. 本間正充; 重大な発がん性物質は変異原性物質である。変異原性物質は in silico で予測できる。従って、発がん性物質は in silico で予測できる。第 46 回日本毒性学会学術年会、6 月 26-28 日、徳島
4. Honma M., Ames/QSAR International Challenge Project. 第 6 回アジア環境変異原学会、第 48 回日本環境変異原学会、11 月 18-20 日、東京
5. 安井学, 福田隆之, 鶴飼明子, 馬庭二郎, 山本春菜, 今村匡志, 藤島沙織, 大谷尚子, 成見香瑞範, 松崎香織, 岡田祐樹, 中川宗洋, 上田摩弥, 三崎健太郎, 足立淳, 小川 久美子, 本間正充: Ames 陽性を示す 10 化学物質のフォローアップに関する TK 遺伝子変異試験の有用性の検討: MMS 共同研究の報告. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会(2019.11.18)
6. 竹入章, 松崎香織, 田中健司, 小川久美子, 安井学, 本間正充, 三島雅之: TK6 細胞におけ

- る γ H2AX 評価は Ames 試験陽性の初期フォローアップとして有用である: MMS 共同研究追加項目. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会 (2019.11.20)
7. 山本美佳, 大谷尚子, 安井学, 小川久美子, 本間正充: Ames 試験陽性のフォローアップとしての *in vitro* Comet assay の有用性の検討: MMS 共同研究オプション試験. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会 (2019.11.18)
 8. Masumura K, Ando T, Ishii Y, Honma M: Dose response of DNA adduct formation and gene mutation induced by acrylamide in *gpt delta* mice. 50th annual meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS) (2019.09)
 9. Masumura K, Ando T, Toyoda-Hokaiwado N, Ukai A, Nohmi T, Honma M: Analyses of ENU-induced germ cell mutations in male mice and inherited germline mutations in the offspring. The 47th annual meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EEMGS) (2019.05)
 10. Masumura K, Ando T, Ukai A, Fujiwara S, Suzuki T, Yokose S, Takagi H, Nohmi T, Honma M: New strain of *gpt delta* transgenic rat is homozygous for transgene and highly improved packaging efficiency. The Joint Meeting of the 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) (2019.11)
 11. 増村健一: Detection of *de novo* germline mutations in the offspring of mutagen-exposed male mice by whole exome/genome sequencing. 日本放射線影響学会第 62 回大会 (2019.11)
 12. 中村賢志, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 石井雄二, 小川久美子「レポーター遺伝子導入動物を用いた包括的毒性試験法による acetamide の評価」第 5 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2019 年 9 月)
 13. 中村賢志, 石井雄二, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「*gpt delta* ラットを用いた acetamide のラット肝発がんメカニズムに関する検討」第 36 回日本毒性病理学会学術集会 (2020 年 2 月)
 14. 今井俊夫, 増井亮一, 中西もも, 中西るり, 町田雪乃, 成瀬美衣: BALB/c 背景 p53(+/-) マウス乳腺オルガノイドに対する DMBA の発がん作用. 第 66 回日本実験動物学会総会 (2019 年 5 月、福岡)
 15. Imai T, Masui R, Nakanishi R, Machida Y, Ochiai M, Naruse M: *In vitro* treatment of DMBA to murine mammary tissue-derived organoids induced adenocarcinomas/squamous cell carcinomas after their subcutaneous injection to nude mice. EuroTox 2019 (2019 年 9 月、ヘルシンキ)
 16. 今井俊夫, 町田雪乃, 落合雅子, 成瀬美衣: DMBA の *in vitro* 処置により誘発されたマウス乳がんの遺伝子変異解析. 第 78 回日本癌学会学術総会 (2019 年 9 月、京都)
 17. Totsuka Y, Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019 年 11 月)
 18. Iwamura K, Shimada H, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Endo O, Totsuka Y., Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019 年 11 月)
 19. Ono H, Nagai M, Narushima D, Hamamoto R, Totsuka Y, Kato M. Detection of DNA adducts by nanopore sequencing using

- deep learning. 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
20. Totsuka Y, Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 日本癌学会学術総会シンポジウム. (京都、2019年9月)
 21. Totsuka Y, Exploration of Esophageal Cancer Etiology using Comprehensive DNA Adduct Analysis (DNA Adductome Analysis) 2nd Hebei International Forum on Theory and Practice of Cancer Prevention and Control (石家荘、2019年7月)
 22. Totsuka Y, How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting (リヨン、2019年7月)
 23. 戸塚ゆ加里 ナノマテリアルの遺伝毒性評価の動向 —JRC 会議に参加して— MMS 定例会 (京都、2019年6月)
 24. 戸塚ゆ加里 発がん性評価法としての DNA アダクトーム解析の展望 日本毒性学会シンポジウム (徳島、2019年6月)
 25. 加藤麻衣、橋詰力、庄司豊、庄司(加藤)久美子、五十嵐美樹、早川清雄、吉川悠子、三好規之: NASH - 肝発がんモデルマウス糞便中揮発性化合物の分析、第73回日本栄養・食糧学会大会 (静岡)、2019年5/17-19
 26. 加藤麻衣、橋詰力、庄司豊、庄司(加藤)久美子、五十嵐美樹、早川清雄、吉川悠子、三好規之: NASH - 肝発がんモデルマウスの糞便中揮発性化合物による発がんバイオマーカー探索、第26回日本がん予防学会(札幌)、2019年 6/28-29
 27. 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: メタボローム解析による膀胱発がん性芳香族アミン化合物の活性代謝物の解明、第26回日本がん予防学会(札幌)、2019年6/28-29
 28. 恒松雄太、吉川悠子、三好規之、武藤倫弘、山地太樹、張萌琳、岩崎基、松田尚久、細見晃司、國澤純、若林敬二、石川秀樹、渡辺賢二: 大腸発がんリスク因子コリバクチンの生産性を制御する要因の解明、第26回日本がん予防学会(札幌)、2019年6/28-29
 29. 佐藤道大、平山裕一郎、恒松雄太、東口ふみ、吉川悠子、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、若林敬二、武藤倫弘、石川秀樹、渡辺賢二: 遺伝毒性物質コリバクチン生産菌の高感度多検体検出法の確立、第26回日本がん予防学会(札幌)、2019年6/28-29
 30. 吉川悠子、平山裕一郎、松崎信生、東口ふみ、恒松雄太、佐藤道大、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、若林敬二、武藤倫弘、石川秀樹、渡辺賢二: 大腸がん患者から分離した遺伝毒性物質コリバクチン合成遺伝子陽性大腸菌の解析、第26回日本がん予防学会(札幌)、2019年6/28-29
 31. 渡辺賢二、恒松雄太、平山裕一郎、東口ふみ、佐藤道大、吉川悠子、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、武藤倫弘、石川秀樹、若林敬二: 大腸がんリスク因子コリバクチン産生菌の増殖抑制を目的としたパイロット介入試験、第26回日本がん予防学会(札幌)、2019年6/28-29
 32. Yuya Tajima, Takeshi Toyoda, Yuichiro Hirayama, Tsutomu Hashidume, Kohei Matsushita, Kumiko Ogawa, Kenji Watanabe, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, Noriyuki Miyoshi: Analysis of urinary bladder carcinogen o-toluidne metabolites forming DNA adduct, ACEM/JEMS2019 (Tokyo)、2019/11/18-20
 33. Ai Ueshima, Yuuta Hisatomi, Yoshimitsu Oda, Yuta Tsunematsu, Michio Sato, Yuichiro Hirayama, Noriyuki Miyoshi, Yuji Iwashita, Yuko Yoshikawa, Haruhiko Sugimura, Takashi Yagi, Keiji Wakabayashi, Kenji Watanabe, Masanobu

- Kawanishi : Genotoxicity of colibactin-producing *E. coli* isolated from Japanese colorectal cancer patient、ACEM/JEMS2019 (Tokyo)、2019/11/18-20
34. Mai Kato, Tsutomu Hashidume, Yutaka Shoji, Kumiko Shoji, Miki Igarashi, Sumio Hayakawa, Yuko Yoshikawa, Noriyuki Miyoshi : Analysis of fecal gaseous metabolites in NASH-hepatocellular carcinoma model mice、ICoFF2019 (Kobe)、2019/12/1-5
35. 丸喜明、筆宝義隆 (口演) : 患者由来婦人科がん検体からのオルガノイド培養. 第 37 回日本ヒト細胞学会学術集会 2019 年 10 月 (東京)
36. 丸喜明、筆宝義隆 (シンポジウム) : オルガノイドを用いた婦人科がんの統合的研究. 第 78 回日本癌学会学術総会 (京都) 2019 年 9 月
37. 吉原靖典、丸喜明、筆宝義隆 (英語口演) : マウスオルガノイドを用いた胃発がんモデルの確立. 第 78 回日本癌学会学術総会 (京都) 2019 年 9 月
38. 丸喜明、筆宝義隆 (示説) : 患者由来卵巣がんからのオルガノイド培養. 第 61 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 (新潟) 2019 年 7 月
39. 丸喜明、筆宝義隆 (示説) : 正常子宮内膜オルガノイドへの遺伝子導入による高転移性がん細胞の直接誘導. 第 28 回日本がん転移学会学術集会・総会 (鹿児島) 2019 年 7 月
40. 丸喜明、筆宝義隆 (示説) オルガノイド培養を用いた婦人科腫瘍の統合的研究 第 108 回日本病理学会総会 (東京) 2019 年 5 月
41. 筆宝義隆 (シンポジウム) : マウスオルガノイドを用いた臓器横断的 *ex vivo* 発がんモデルの確立. 第 32 回モロシヌス研究会 (千葉) 2019 年 7 月
42. 丸喜明、筆宝義隆 (口演) : Establishment of Cell-based Carcinogenesis Models with Genetic Reconstitution of Murine Gastric Organoids. 第 34 回発癌病理研究会 (鳥羽) 2019 年 8 月
43. 丸喜明、筆宝義隆 (口演) : オルガノイドを

用いた婦人科がんの統合的研究. 第 1 回日本癌学会若手の会 (熱海) 2020 年 2 月

44. 入澤祐太、平田暁大、酒井洋樹、今井俊夫 : マウス正常組織由来オルガノイドの施設間輸送の最適条件の検討. 第 36 回日本毒性病理学会 (2020 年 2 月、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

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

分担研究課題名：QSARとAmes試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究

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

研究要旨

H30年の本分担研究において、2つのQSARツール（DEREK Nexus、CASE Ultra）は90%の精度で香料化合物のAmes変異原性を予測できることがわかった。一方、予測が外れた、もしくは予測が困難な化合物群として、フラン類、チオエーテル類、チオール類が挙げられた。本年度はこれら類に属する物質、それぞれ1化合物についてAmes試験を実施し、QSAR予測のケミカルスペースの拡大を図った。

本年度はさらに香料のAmes試験データベースを精査・整備した。小野らの報告にあった367物質の香料の内、11物質については結果が不確定（Equivocal）であったが、専門家判断もしくは再試験により、8化合物についてAmes試験結果を確定させた。また、国立衛研・変異遺伝部でAmes試験を実施した新たな香料化合物をデータベースに加え、390物質からなる新規Ames試験データベースを完成させた。

キーワード:食品香料、エームス試験、定量的構造活性相関（QSAR）

A. 研究目的

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

るが、世界で共通に使用されている香料は1,550品目に過ぎない。香料の安全性評価に各国の相違があることに原因の一つがあるが、早期の国際的調和が望まれる。

香料は、一般に数十から数百種類混合して用いられることが多いが、個々の香料の食品への添加量は数pptから数ppmレベルで有り、過剰摂取は考えられないことから、一般毒性の懸念は少なく、問題となる毒性は変異原性である。変異原性はがんの原因で有り、DNAに損傷を与え、突然変異を誘発し、その作用には、閾値がないと考えられている。従って、変異原性のある化学物質の

摂取は、それがたとえ微量であっても、発がんリスクはゼロにはならないため厳しい管理が要求される。JECFA では変異原性を含むいかなる毒性であっても、その曝露レベルが TTC (毒性学的懸念の閾値) 以下であれば安全性に問題ないとしているが、暴露評価が適切に行われていない場合は、変異原性の有無が問題となることが多い。そのため、食品香料の安全性評価のためには適切な変異原性試験の実施が重要である。

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

本研究班では食品香料化合物データベースに収載の物質について、Lhasa Limited (UK) の DEREK Nexus と MultiCASE Inc. (USA) の CASE Ultra を用いて Ames 試験結果の QSAR 予測計算を行い、陽性と予測された香料については実試験を実施し、予測結果の評価を行うと同時に、香料の Ames 試験データベースの充実を図っている。今年度は、QSAR 予測が困難な考えられるフラン類、チオエーテル類、チオール類について Ames 試験を実施し、予測のためのケミカルスペースの拡大を行う。また、これまで報告されてきた香料の Ames 試験データベースを精査、また最近実施された Ames 試験結果をデータベースに取り込むことにより、データベースの拡大と堅牢化をおこなう。

B. 研究方法

B.1. Ames 試験対象物質

以下のフラン化合物 (1 種)、チオエーテル (1 種)、チオール化合物 (1 種) を今年度の Ames 試験対象物質とした。

- ① 4,5-Dihydro-2,5-dimethyl-4-oxofuran-3-yl

butyrate (Cas# 114099-96-6)

- ② 2,4,4-trimethyl-1,3-oxathiane (Cas# 72472-02-7)

- ③ 2-methyl-2-butanethiol (Cas# 1679-09-0)

B.2. Ames 試験

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

C. 研究結果、および考察

Ames 試験実施 3 化合物の QSAR 予測結果と実際の試験結果を表 1 に示す。フラン化合物の 4,5-Dihydro-2,5-dimethyl-4-oxofuran-3-yl butyrate (Cas# 114099-96-6) は 2 つの QSAR で陽性/陰性の相反した予測を行ったが、実際には陽性を示した。陽性反応は、TA100 で代謝活性化の有無にかかわらず観察されたが、代謝活性化の方が顕著であった。最大比活性値は 38rev/mg であった。これまで報告されているフラン化合物の Ames 試験結果を表 2 にまとめた。本化合物はエステル分解により

2,5-dimethyl-4-oxo-3(5H)-furyl acetate (4) と同じ代謝物 (水酸化体 (2)) を生成するため、類似の変異原性を示すと考えられる。一方、メトキシ体である

4-methoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (5) は変異原性を示さない。水酸化体である

4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (2) の変異原性の程度が重要と考えられるが、残念ながらその情報は無い。今後の検証が必要と考えられる。いずれにせよ、フラン体の中でもフランン体 (1, 2, 4, 7) の変異原性はさほど強くない

物と推察される。

一方、チオエーテル類の 2,4,4-trimethyl-1,3-oxathiane と、チオール類の 2-methyl-2-butanethiol は Case Ultra では Out of Domain で予測が困難であった (表 1)。これは試験された化合物数が少なかったためと予測される。今回、代表的な 2 つの化合物で陰性であったことから、基本的にはチオエーテル類と、チオール類は変異原性を示さないと考えても差し支えないと考えられる。

小野らは 367 物質の香料の Ames 試験結果をまとめ、データベース化した (Ono et al., Food Chem Toxicol, 50, 1538-1546, 2012)。この内、11 物質については結果が不確定 (Equivocal) であった。今回、試験結果の再レビューを行い、専門家的考察により、4 物質に関しては陰性、3 物質に関しては陽性と判断した (表 3)。尚、allyl isothiocyanate (Cas#75-06-7) に関しては再試験を実施し、陰性と結論づけた。残り、3 化合物 (ethyl maltol、2-hydroxy-1,2-diphenylethanone、

3-propylidene-phthalide) 専門家判断が紺案で有り、結論には再試験が必要とされた。

小野らのデータベースに加え、2010 年から国立衛研・変異遺伝部で、Ames 試験委託した香料化合物のデータベース (390 化合物) を表 4 に示す。その内訳は、陰性：350 物質、陽性：37 化合物、未定：3 化合物である。陽性化合物については、順次 *in vivo* トランスジェニック突然変異試験を (TGR) を行い、その安全性を確認している。また、本データベースは、QSAR ツールの予測性の評価のための標準物質データベース、および新規 QSAR モデル開発のためのトレーニングデータとしても利用可能である。

D. 結論

QSAR による予測が困難であったフラン類、チオエーテル類、チオール類について、実際に Ames 試験を実施し、変異原性を確認した。概ねフラン類に関しては陽性、チオエーテル類、

チオール類に関しては陰性と判断されるが、他の官能基も性質も考慮する必要がある。既存の香料 Ames 試験データベースを精査し、さらに新たに実施した Ames 試験結果を加えた、新規香料エームス試験データベース (490 化合物) を完成させた。本データベースは信頼性が高く、香料の変異原性の予測に特化したローカル QSAR モデルの開発に有用であると考えられる。

E. 研究発表

誌上発表

1. 本間正充；医薬品中の変異原性不純物の安全性評価と管理—ICH-M7 を踏まえた遺伝毒性物質の許容値の設定に関する科学— PHARM TECH JAPAN 35(8), 1461-1469, 2019.
2. 本間正充；食品中に混在する微量な化学物質の安全性評価 一定量の構造活性相関 (QSAR) による変異原性化学物質の同定—日本包装学会誌 29 (1), 27-42, 2020
3. 本間正充；化学物質の遺伝毒性評価と定量的構造相関 ((Q) SAR) ポリ衛協会報 65, 5-25, 2019
4. 本間正充；毒性試験の未来を考える — (定量的) 構造活性相関による化学物質の変異原性評価 — 国立医薬品食品衛生研究所報告 137, 20-31, 2019
5. Hasselgren C, Ahlberg E, Akahori Y, Amberg A, Anger LT, Atienzar F, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cronin MTD, Crooks I, Cross KP, Custer L, Dobo K, Doktorova T, Faulkner D, Ford KA, Fortin MC, Frericks M, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Barton-Maclaren TS, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R,

Kenyon MO, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Masten S, Miller S, Moudgal C, Muster W, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Schilter B, Snyder RD, Stavitskaya L, Stidl R, Szabo DT, Teasdale A, Tice RR, Trejo-Martin A, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Myatt GJ. Genetic toxicology in silico protocol. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2019 Oct; 107:104403. doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104403. Epub 2019 Jun 11. PubMed PMID: 31195068.

6. Petko I, Petkov, Chanita Kuseva, Stefan Kotov, Masamitsu Honma, Airi Kitazawa, Sunil Kulkarni, Terry W. Schultz, Ovanes G. Mekenyan. Procedure for toxicological predictions based on mechanistic weight of evidences: Application to Ames mutagenicity. *Computational Toxicology* 12, 2019; doi.org/10.1016/J.COMTOX.2017.02.004

学会発表

1. Honma M., Improvement of Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) Tools for Predicting Ames Mutagenicity. 第 47 回欧州環境変異ゲノム学会 2019 年 19-23 日、フランス、レンヌ
2. 本間正充 ; ICH-M7(医薬品中の DNA 反応性不純物の評価と管理)に関するガイドライン、第 74 回 MMS 研究会定例会、6 月 14 日、京都
3. 本間正充 ; 重大な発がん性物質は変異原性物質である。変異原性物質は in silico で予測できる。従って、発がん性物質は in silico で予測できる。第 46 回日本毒性学会学術年会、6 月 26-28 日、徳島
4. Honma M., Ames/QSAR International Challenge Project. 第 6 回アジア環境変異原学会、第 48 回日本環境変異原学会、11 月 18-20 日、東京

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 R1年度試験化合物 QSAR予測 Ames試験結果

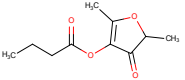
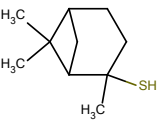
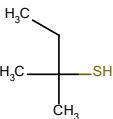
CAS#	物質名	構造	SMILES	Derek Nexus	CASE ULTRA GT1_BMUT Probability (%)	Ames結果	結果詳細
114099-96-6	4,5-Dihydro-2,5-dimethyl-4-oxofuran-3-yl butyrate (2,5-dimethyl-4-oxo-4,5-dihydro-3-furyl butyrate)		CCCC(=O)OC1=C(OC(C1=O)C)C	PLAUSIBLE	Negative 22.9	Positive	<p>本被験物質は代謝活性化存在下のSalmonella typhimurium TA100において、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値が、用量設定試験では5000 µg/plateにて背景データの陰性対照の変動範囲の上限を超える増加が認められ、本試験及び確認試験では背景データの陰性対照の変動範囲の上限を超え、かつ陰性対照の平均値の2倍以上に増加させた。また、その増加に用量反応性が認められ、本試験及び確認試験において試験結果の再現性が確認された。最大比活性値は、本試験における代謝活性化存在下のSalmonella typhimurium TA100において、38.0 (5000 µg/plate) を示した。</p> <p>一方、陽性対照は、代謝活性化の有無に関わらず全ての菌株に対して、復帰変異コロニー数を陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の平均値は、全ての試験において背景データの変動範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある要因についても、何ら認められなかった。</p> <p>以上の結果より、本試験条件下において本被験物質は遺伝子突然変異誘発性を有すると判断する。</p>
23832-18-0	2-,3-,10-mercaptopinane (2-mercaptopinane)		CC1(C)C2CC1C(O)(S)CC2	INACTIVE	Out of Domain 10.6	Negative	<p>本被験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復帰変異コロニー数は、用量設定試験において、代謝活性化存在下Salmonella typhimurium TA100にて背景データの陰性対照の変動範囲の上限を超える増加が認められた。しかし、本試験及び確認試験では変動範囲の上限を超える増加は認められなかった。よってこれらの増加は偶発的なものであり、生物学的に意味のある増加ではないと判断した。</p> <p>陽性対照は、代謝活性化の有無に関わらず全ての菌株に対して、復帰変異コロニー数を陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の平均値は、全ての試験において背景データの変動範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある要因についても、何ら認められなかった。</p> <p>以上の結果より、本試験条件下において本被験物質は遺伝子突然変異誘発性を有さないと判断する。</p>
1679-09-0	2-methyl-2-butanethiol		CC(S)(CC)C	INACTIVE	Out of Domain 22.9	Negative	<p>代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復帰変異コロニー数は、全ての用量において背景データの陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。また、用量設定試験、本試験及び確認試験において、試験結果に再現性も得られた。</p> <p>陽性対照は、代謝活性化の有無に関わらず全ての菌株に対して、復帰変異コロニー数を陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の平均値は、全ての試験において背景データの変動範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある要因についても、何ら認められなかった。</p> <p>以上の結果より、本試験条件下において本被験物質は遺伝子突然変異誘発性を有さないと判断する。</p>

表2 フラン化合物のAmes試験結果の比較

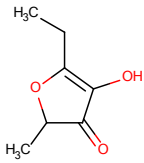
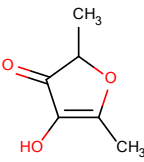
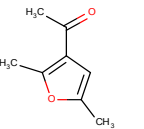
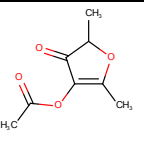
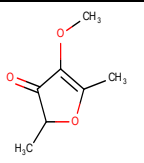
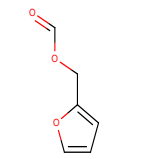
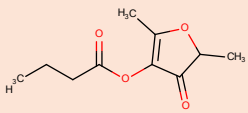
No.	物質名	構造	分類	Ames 結果	Ames最大比活性値 (rev./mg)	Derek Nexus	Case Ultra
1	5-ethyl-4-hydroxy-2-methyl-3(2H)-furanone		ケトン類	陽性	不明	PLAUSIBLE	Positive
2	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone		ケトン類	陽性	不明	PROBABLE	Known Positive
3	3-acetyl-2,5-dimethylfuran (3-アセチル-2,5-ジメチルフラン)		ケトン類	陽性	1281	EQUIVOCAL	Known Positive
4	2,5-dimethyl-4-oxo-3(5H)-furyl acetate (2,5-ジメチル-4-オキソ-3(5H)-フリルアセテート)		エステル類	陽性	77	PLAUSIBLE	Negative
5	4-methoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (4-メトキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-フランオン)		ケトン類	陰性	-	PLAUSIBLE	Negative
6	furfuryl formate (フルフリルフォルメート)		エステル類	陽性	396	EQUIVOCAL	Inconclusive
7	4,5-Dihydro-2,5-dimethyl-4-oxofuran-3-yl butyrate		エステル類	陽性	38	PLAUSIBLE	Negative

表3 香料データベースの見直し

JECFA No.	Chemical name	CAS#	Structure	Original Ames result *1	Revised Ames result ('19 Aug 21)
1776	ethyl 2-[(5-methyl-2-propan-2-yl)cyclohexane]	68489-14-5	<chem>CCOC(=O)CNC(=O)C1CC(C)CCC1C(C)C</chem>	Equivocal	Negative
1172	6-methylcoumarin	92-48-8	<chem>CC1=CC2=C(C=C1)O[C](=O)C=C2</chem>	Equivocal	Negative
252	isobutanal	78-84-2	<chem>CC(C)C=O</chem>	Equivocal	Negative
690	phenol	108-95-2	<chem>OC1=CC=CC=C1</chem>	Equivocal	Negative
1560	*2 allyl isothiocyanate	57-06-7	<chem>C=CCN=C=S</chem>	Equivocal	Negative
1561	butyl isothiocyanate	592-82-5	<chem>CCCCN=C=S</chem>	Equivocal	Positive
1450	4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone	19322-27-1	<chem>CC1=C(O)C(=O)CO1</chem>	Equivocal	Positive
1563	phenethyl isothiocyanate	2257-09-2	<chem>S=C=NCCC1=CC=CC=C1</chem>	Equivocal	Positive
1481	ethyl maltol	4940-11-8	<chem>CCC1=C(O)[C](=O)C=CO1</chem>	Equivocal	Equivocal
836	2-hydroxy-1,2-diphenylethanone	119-53-9	<chem>OC(C(=O)C1=CC=CC=C1)C2=CC=CC=C2</chem>	Equivocal	Equivocal
1168	3-propylideneephthalide	17369-59-4	<chem>CC=C=C1C(=O)C2=C1C=CC=C2</chem>	Equivocal	Equivocal

*1 Original results were from Ono et al., Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavor chemicals. Food Chem Toxicol, 50, 1538-1546 (2012)

*2 allyl isothiocyanate was actually re-tested, and a negative result was obtained.

表4 香料物質 Ames試験結果データベース (390化合物)

No.	Chemical name	CAS#	Ames result ('19 Aug 21)
1	acetaldehyde	75-07-0	Negative
2	acetic acid	64-19-7	Negative
3	acetone	67-64-1	Negative
4	acetophenone	98-86-2	Negative
5	4-acetyl-6-tert-butyl-1,1-dimethylindane	13171-00-1	Negative
6	3-acetylpyridine	350-03-8	Negative
7	aconitic acid	499-12-7	Negative
8	adipic acid	124-04-9	Negative
9	allyl hexanoate	123-68-2	Negative
10	alpha-amylcinnamaldehyde	122-40-7	Negative
11	alpha-amylcinnamyl alcohol	101-85-9	Negative
12	benzaldehyde	100-52-7	Negative
13	N-4-benzeneacetonitrile-3-p-menthancarboxamide	852379-28-3	Negative
14	benzenemethanethiol	100-53-8	Negative
15	benzenethiol	108-98-5	Negative
16	benzoic acid	65-85-0	Negative
17	benzophenone	119-61-9	Negative
18	N-benzoylanthranilic acid	579-93-1	Negative
19	benzyl acetate	140-11-4	Negative
20	benzyl alcohol	100-51-6	Negative
21	benzyl benzoate	120-51-4	Negative
22	benzyl cinnamate	103-41-3	Negative
23	benzyl formate	104-57-4	Negative
24	benzyl isothiocyanate	622-78-6	Negative
25	benzyl isoeugenyl ether	120-11-6	Negative
26	butanal	123-72-8	Negative
27	butanol	71-36-3	Negative
28	2-butanone	78-93-3	Negative
29	4-(butoxymethyl)-2-methoxyphenol	82654-98-6	Negative
30	butyl acetate	123-86-4	Negative
31	butyl anthranilate	7756-96-9	Negative
32	butyl butyryllactate	7492-70-8	Negative
33	sec-butyl ethyl ether	2679-87-0	Negative
34	butyl 4-hydroxybenzoate	94-26-8	Negative
35	butyl stearate	123-95-5	Negative
36	sec-butylamine	13952-84-6	Negative
37	butylamine	109-73-9	Negative
38	butyric acid	107-92-6	Negative
39	gamma-butyrolactone	96-48-0	Negative
40	camphene	79-92-5	Negative
41	carveol	99-48-9	Negative
42	carvyl acetate	97-42-7	Negative
43	beta-caryophyllene	87-44-5	Negative
44	beta-caryophyllene oxide	1139-30-6	Negative
45	1,8-cineole	470-82-6	Negative
46	cinnamic acid	621-82-9	Negative
47	cinnamyl alcohol	104-54-1	Negative

48	citral	5392-40-5	Negative
49	citronellal	106-23-0	Negative
50	citronellol	106-22-9	Negative
51	cyclohexanone	108-94-1	Negative
52	cyclohexyl anthranilate	7779-16-0	Negative
53	cyclohexyl butyrate	1551-44-6	Negative
54	cyclohexyl cinnamate	7779-17-1	Negative
55	cyclopentanone	120-92-3	Negative
56	2,4-decadienal	2363-88-4	Negative
57	decanal	112-31-2	Negative
58	decanoic acid	334-48-5	Negative
59	1-decen-3-ol	51100-54-0	Negative
60	dibenzyl disulfide	150-60-7	Negative
61	dibenzyl ether	103-50-4	Negative
62	dibutyl sebacate	109-43-3	Negative
63	diethyl malonate	105-53-3	Negative
64	3,5-diethyl-1,2,4-trithiolane	54644-28-9	Negative
65	dihydroactinidiolide	15356-74-8	Negative
66	dihydrocoumarin	119-84-6	Negative
67	2,5-dihydroxy-1,4-dithiane	40018-26-6	Negative
68	3,4-dimethoxybenzaldehyde	120-14-9	Negative
69	1,2-dimethoxybenzene	91-16-7	Negative
70	1,3-dimethoxybenzene	151-10-0	Negative
71	1,4-dimethoxybenzene	150-78-7	Negative
72	2,6-dimethoxyphenol	91-10-1	Negative
73	3-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-2-propenamide	69444-90-2	Negative
74	N-[(2,4-dimethoxyphenyl)methyl]-N'-[2-(2-pyridinyl)ethyl]ethanediamide	745047-53-4	Negative
75	dimethyl succinate	106-65-0	Negative
76	dimethyl disulfide	624-92-0	Negative
77	4-tert-butylphenol	98-54-4	Negative
78	2,6-dimethyl-4-heptanone	108-83-8	Negative
79	2,6-dimethyl-5-heptenal	106-72-9	Negative
80	2,6-dimethyloctanal	7779-07-9	Negative
81	2,5-dimethylphenol	95-87-4	Negative
82	2,6-dimethylphenol	576-26-1	Negative
83	3,4-dimethylphenol	95-65-8	Negative
84	2,3-dimethylpyrazine	5910-89-4	Negative
85	2,5-dimethylpyrazine	123-32-0	Negative
86	4,5-dimethylthiazole	3581-91-7	Negative
87	1,4-dioxacycloheptadecane-5,17-dione	105-95-3	Negative
88	diphenyl	92-52-4	Negative
89	diphenyl disulfide	882-33-7	Negative
90	diphenyl ether	101-84-8	Negative
91	diallyl disulfide	2179-57-9	Negative
92	diallyl sulfide	592-88-1	Negative
93	lauric acid	143-07-7	Negative
94	dodecanol	112-53-8	Negative
95	1,2-ethanedithiol	540-63-6	Negative
96	ethanethioic S-acid	507-09-5	Negative
97	2-ethenyl-5-isopropenyl-2-methyltetrahydrofuran	13679-86-2	Negative
98	4-ethoxybenzaldehyde	10031-82-0	Negative
99	2-ethoxy-5-(1-propenyl)phenol	94-86-0	Negative

100	ethyl acetoacetate	141-97-9	Negative
101	ethyl anthranilate	87-25-2	Negative
102	ethyl cinnamate	103-36-6	Negative
103	ethyl 2,4,7-decatrienoate	78417-28-4	Negative
104	ethyl lactate	97-64-3	Negative
105	ethyl isovalerate	108-64-5	Negative
106	ethyl 4-methylphenoxyacetate	67028-40-4	Negative
107	ethyl beta-methyl-beta-phenylglycidate	77-83-8	Negative
108	ethyl 2-naphthyl ether	93-18-5	Negative
109	ethyl pyruvate	617-35-6	Negative
110	ethyl phenylacetate	101-97-3	Negative
111	ethyl benzoylacetate	94-02-0	Negative
112	ethyl acrylate	140-88-5	Negative
113	ethylamine	75-04-7	Negative
114	3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	13360-65-1	Negative
115	2-ethylhexanol	104-76-7	Negative
116	2-ethyl-3-methylpyrazine	15707-23-0	Negative
117	4-ethylphenol	123-07-9	Negative
118	2-ethylpyrazine	13925-00-3	Negative
119	3-ethylpyridine	536-78-7	Negative
120	ethylvanillin	121-32-4	Negative
121	ethylvanillin isobutyrate	188417-26-7	Negative
122	eugenol	97-53-0	Negative
123	farnesol	4602-84-0	Negative
124	formic acid	64-18-6	Negative
125	fumaric acid	110-17-8	Negative
126	geraniol	106-24-1	Negative
127	geranyl acetate	105-87-3	Negative
128	glycerine	56-81-5	Negative
129	gamma-heptalactone	105-21-5	Negative
130	heptanal	111-71-7	Negative
131	heptanoic acid	111-14-8	Negative
132	N-(4-heptyl)-1,3-benzodioxole-5-carboxamide	745047-51-2	Negative
133	hexadecanol	36653-82-4	Negative
134	hexanal	66-25-1	Negative
135	3,4-hexanedione	4437-51-8	Negative
136	hexanoic acid	142-62-1	Negative
137	alpha-hexylcinnamaldehyde	101-86-0	Negative
138	2-hexylidenecyclopentanone	17373-89-6	Negative
139	2-hydroxyacetophenone	118-93-4	Negative
140	salicylaldehyde	90-02-8	Negative
141	acetoin	513-86-0	Negative
142	hydroxycitronellal	107-75-5	Negative
143	hydroxycitronellal dimethylacetal	141-92-4	Negative
144	hydroxycitronellol	107-74-4	Negative
145	2-hydroxy-2-cyclohexenone	10316-66-2	Negative
146	2-hydroxy-N-(2-hydroxyethyl)propanamide	5422-34-4	Negative
147	cyclotene	80-71-7	Negative
148	indole	120-72-9	Negative
149	alpha-ionone	127-41-3	Negative
150	beta-ionone	14901-07-6	Negative
151	isobutyl anthranilate	7779-77-3	Negative

152	isobutyl 2-naphthyl ether	2173-57-1	Negative
153	isobutyl phenylacetate	102-13-6	Negative
154	isobutylamine	78-81-9	Negative
155	isobutyric acid	79-31-2	Negative
156	isoeugenol	97-54-1	Negative
157	isopropyl acetate	108-21-4	Negative
158	isopropanol	67-63-0	Negative
159	isopropyl myristate	110-27-0	Negative
160	cuminaldehyde	122-03-2	Negative
161	cuminy alcohol	536-60-7	Negative
162	p-cymene	99-87-6	Negative
163	thymol	89-83-8	Negative
164	lactic acid	598-82-3	Negative
165	linalool	78-70-6	Negative
166	linalyl acetate	115-95-7	Negative
167	linalyl anthranilate	7149-26-0	Negative
168	p-menthane-3,8-diol	42822-86-6	Negative
169	menthofuran	494-90-6	Negative
170	dl-menthol	89-78-1	Negative
171	menthone 1,2-glyceryl acetal	63187-91-7	Negative
172	3-(l-menthoxy)-2-methylpropane-1,2-diol	195863-84-4	Negative
173	l-menthyl 2-hydroxyethyl carbonate	156324-78-6	Negative
174	3-mercapto-2-methylbutanol	227456-33-9	Negative
175	2-mercaptopropionic acid	79-42-5	Negative
176	methanedithiol	6725-64-0	Negative
177	4'-methoxy-alpha-methylcinnamaldehyde	65405-67-6	Negative
178	anisaldehyde	123-11-5	Negative
179	anisole	100-66-3	Negative
180	anisyl alcohol	105-13-5	Negative
181	2'-methoxycinnamaldehyde	1504-74-1	Negative
182	1-methoxy-4-methylbenzene	104-93-8	Negative
183	2-methoxy-6-methylpyrazine	2882-21-5	Negative
184	2-methoxy-3-methylpyrazine	2847-30-5	Negative
185	guaiaicol	90-05-1	Negative
186	anisylacetone	104-20-1	Negative
187	1-(4-methoxyphenyl)-1-penten-3-one	104-27-8	Negative
188	isoeugenyl phenylacetate	120-24-1	Negative
189	1-methoxy-4-propylbenzene	104-45-0	Negative
190	methyl acetate	79-20-9	Negative
191	S-methyl 2-acetoxypropanethioate	74586-09-7	Negative
192	methyl anthranilate	134-20-3	Negative
193	S-methyl butanethioate	2432-51-1	Negative
194	methyl N-formylanthranilate	41270-80-8	Negative
195	methyl salicylate	119-36-8	Negative
196	methyl linoleate	112-63-0	Negative
197	methyl 4-methoxybenzoate	121-98-2	Negative
198	methyl N-methylantranilate	85-91-6	Negative
199	methyl 2-naphthyl ether	93-04-9	Negative
200	methyl beta-naphthyl ketone	93-08-3	Negative
201	methyl 2-nonynoate	111-80-8	Negative
202	methyl 2-octynoate	111-12-6	Negative
203	S-methyl 2-(propionyloxy)propanethioate	827024-53-3	Negative

204	2-methylbutanal	96-17-3	Negative
205	2-methylbutanol	137-32-6	Negative
206	isoamyl alcohol	123-51-3	Negative
207	isoamyl benzoate	94-46-2	Negative
208	isoamyl formate	110-45-2	Negative
209	isoamyl phenylacetate	102-19-2	Negative
210	isovaleraldehyde	590-86-3	Negative
211	alpha-methylcinnamaldehyde	101-39-3	Negative
212	4-methyldiphenyl	644-08-6	Negative
213	piperine	94-62-2	Negative
214	isopropylamine	75-31-0	Negative
215	5-methylfurfural	620-02-0	Negative
216	6-methyl-3,5-heptadien-2-one	1604-28-0	Negative
217	6-methyl-5-hepten-2-one	110-93-0	Negative
218	alpha-methylionone	7779-30-8	Negative
219	methyl-delta-ionone	7784-98-7	Negative
220	1-methylnaphthalene	90-12-0	Negative
221	3-methyl-2,4-nonanedione	113486-29-6	Negative
222	2-methylpentanal	123-15-9	Negative
223	4-methyl-2-pentanone	108-10-1	Negative
224	2-methyl-2-pentenal	623-36-9	Negative
225	4-methyl-3-penten-2-one	141-79-7	Negative
226	2-methylphenol	95-48-7	Negative
227	3-methylphenol	108-39-4	Negative
228	4-methylphenol	106-44-5	Negative
229	(4-methylphenyl)acetaldehyde	104-09-6	Negative
230	3-methyl-1-phenyl-3-pentanol	10415-87-9	Negative
231	2-methyl-1-phenyl-2-propyl formate	10058-43-2	Negative
232	isobutanol	78-83-1	Negative
233	N-isobutyl-trans,trans-2,4-decadienamide	18836-52-7	Negative
234	2-methylpyrazine	109-08-0	Negative
235	5-methylquinoxaline	13708-12-8	Negative
236	4-methylthiazole	693-95-8	Negative
237	5-methyl-2-thienylcarbaldehyde	13679-70-4	Negative
238	6-(methylthio)hexyl isothiocyanate	4430-39-1	Negative
239	{1-methyl-2-[(1,2,2-trimethylbicyclo[3.1.0]hex-3-yl)methyl]cyclopropyl}methanol	NO_CAS	Negative
240	beta-myrcene	123-35-3	Negative
241	trans,trans-2,4-nonadienal	5910-87-2	Negative
242	gamma-nonalactone	104-61-0	Negative
243	nonanal	124-19-6	Negative
244	2-nonenal	2463-53-8	Negative
245	stearic acid	57-11-4	Negative
246	oleic acid	112-80-1	Negative
247	octahydro-2H-1-benzopyran-2-one	4430-31-3	Negative
248	octanal	124-13-0	Negative
249	octanoic acid	124-07-2	Negative
250	octanol	111-87-5	Negative
251	trans-2-octenal	2548-87-0	Negative
252	pyruvic acid	127-17-3	Negative
253	15-pentadecanolide	106-02-5	Negative
254	amyl alcohol	71-41-0	Negative
255	3-penten-2-one	625-33-2	Negative

256	pentylamine	110-58-7	Negative
257	perillaldehyde	2111-75-3	Negative
258	2-phenoxyethyl isobutyrate	103-60-6	Negative
259	phenyl salicylate	118-55-8	Negative
260	phenylacetaldehyde	122-78-1	Negative
261	phenylacetic acid	103-82-2	Negative
262	4-phenyl-3-buten-2-ol	17488-65-2	Negative
263	styrallyl alcohol	98-85-1	Negative
264	phenethyl alcohol	60-12-8	Negative
265	phenethyl anthranilate	133-18-6	Negative
266	1-phenyl-2-pentanol	705-73-7	Negative
267	2-phenylpropanal	93-53-8	Negative
268	3-phenylpropanal	104-53-0	Negative
269	2-phenylpropanal dimethyl acetal	90-87-9	Negative
270	1-phenyl-1,2-propanedione	579-07-7	Negative
271	2-phenylpropanol	1123-85-9	Negative
272	1-phenyl-1-propanone	93-55-0	Negative
273	2-phenylpropyl isobutyrate	65813-53-8	Negative
274	2-(3-phenylpropyl)tetrahydrofuran	3208-40-0	Negative
275	alpha-pinene	80-56-8	Negative
276	beta-pinene	127-91-3	Negative
277	piperazine	110-85-0	Negative
278	piperidine	110-89-4	Negative
279	piperonal	120-57-0	Negative
280	piperonyl acetate	326-61-4	Negative
281	propanal	123-38-6	Negative
282	propanol	71-23-8	Negative
283	2-propenethiol	870-23-5	Negative
284	allyl cinnamate	1866-31-5	Negative
285	S-allyl hexanethioate	156420-69-8	Negative
286	allyl isovalerate	2835-39-4	Negative
287	allyl propyl disulfide	2179-59-1	Negative
288	propionic acid	79-09-4	Negative
289	propyleneglycol dibenzoate	19224-26-1	Negative
290	pulegone	89-82-7	Negative
291	pyrazine	290-37-9	Negative
292	pyrrole	109-97-7	Negative
293	pyrrolidine	123-75-1	Negative
294	isoquinoline	119-65-3	Negative
295	safranal	116-26-7	Negative
296	skatole	83-34-1	Negative
297	gamma-terpinene	99-85-4	Negative
298	alpha-terpineol	98-55-5	Negative
299	beta-terpineol	138-87-4	Negative
300	myristic acid	544-63-8	Negative
301	tetrahydrofurfuryl alcohol	97-99-4	Negative
302	tetrahydrofurfuryl propionate	637-65-0	Negative
303	tetramethyl ethylcyclohexenone	17369-60-7	Negative
304	2,3,5,6-tetramethylpyrazine	1124-11-4	Negative
305	triethylamine	121-44-8	Negative
306	trimethylamine	75-50-3	Negative
307	2,2,6-trimethylcyclohexanone	2408-37-9	Negative

308	isophorone	78-59-1	Negative
309	3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrienal	19317-11-4	Negative
310	2,3,5-trimethylpyrazine	14667-55-1	Negative
311	2,6,10-trimethyl-9-undecenal	141-13-9	Negative
312	gamma-undecalactone	104-67-6	Negative
313	undecanal	112-44-7	Negative
314	vanillin	121-33-5	Negative
315	ethyl 2-[(5-methyl-2-propan-2-ylcyclohexanecarbonyl)amino]acetate	68489-14-5	Negative
316	6-methylcoumarin	92-48-8	Negative
317	isobutanal	78-84-2	Negative
318	phenol	108-95-2	Negative
319	allyl isothiocyanate	57-06-7	Negative
320	acetaldehyde diethyl acetal	105-57-7	Negative
321	2-butoxyethyl acetate	112-07-2	Negative
322	butyl 2-naphthyl ether	10484-56-7	Negative
323	5-decenoic acid	16424-55-8	Negative
324	6-decenoic acid	85392-04-7	Negative
325	dimethyl sulfide	75-18-3	Negative
326	2,4-dimethyl-4-phenyltetrahydrofuran	82461-14-1	Negative
327	delta-dodecalactone	713-95-1	Negative
328	4-ethenyl-2-methoxyphenol	7786-61-0	Negative
329	2-ethylbutanal	97-96-1	Negative
330	vanillin propyleneglycol acetal	68527-74-2	Negative
331	2-furanmethanethiol	98-02-2	Negative
332	furfural	98-01-1	Negative
333	furfuryl alcohol	98-00-0	Negative
334	hexanal propyleneglycol acetal	1599-49-1	Negative
335	2-hexenol	2305-21-7	Negative
336	5-hexenyl isothiocyanate	49776-81-0	Negative
337	hexyl acetate	142-92-7	Negative
338	linalool oxide (furanoid)	1365-19-1	Negative
339	2-(l-menthoxy)ethanol	38618-23-4	Negative
340	4-methoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	4077-47-8	Negative
341	isoeugenyl methyl ether	93-16-3	Negative
342	S-methyl methanethiosulfonate	2949-92-0	Negative
343	4-methylbenzaldehyde	104-87-0	Negative
344	2-methylbutyric acid	116-53-0	Negative
345	5-methyl-2-phenyl-2-hexenal	21834-92-4	Negative
346	2-(4-methyl-5-thiazolyl)ethanol	137-00-8	Negative
347	1,3,5-undecatriene	16356-11-9	Negative
348	2,5-dimethyl-4-oxo-3(5H)-furyl acetate	4166-20-5	Positive
349	2,3-pentanedione	600-14-6	Positive
350	2-acetylpyrrole	1072-83-9	Positive
351	diacetyl	431-03-8	Positive
352	delta-cadinene	483-76-1	Positive
353	cinnamaldehyde	104-55-2	Positive
354	dimethyl sulfoxide	67-68-5	Positive
355	2,6-dimethylpyrazine	108-50-9	Positive
356	ethyl beta-phenylglycidate	121-39-1	Positive
357	5-ethyl-4-hydroxy-2-methyl-3(2H)-furanone	27538-09-6	Positive
358	furfuryl acetate	623-17-6	Positive
359	trans,trans-2,4-hexadienal	142-83-6	Positive

360	2-hexenal	505-57-7	Positive
361	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	3658-77-3	Positive
362	3-hydroxyphenol	108-46-3	Positive
363	maltol	118-71-8	Positive
364	trans-anethole	4180-23-8	Positive
365	6-methylquinoline	91-62-3	Positive
366	2-oxopropanal	78-98-8	Positive
367	trans-2-pentenal	764-39-6	Positive
368	1-penten-3-one	1629-58-9	Positive
369	4-phenyl-3-buten-2-one	122-57-6	Positive
370	2-phenylphenol	90-43-7	Positive
371	thiazole	288-47-1	Positive
372	butyl isothiocyanate	592-82-5	Positive
373	4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone	19322-27-1	Positive
374	phenethyl isothiocyanate	2257-09-2	Positive
375	3-acetyl-2,5-dimethylfuran	10599-70-9	Positive
376	furfural propyleneglycol acetal	4359-54-0	Positive
377	furfuryl formate	13493-97-5	Positive
378	raspberry ketone	5471-51-2	Positive
379	4'-methoxycinnamaldehyde	1963-36-6	Positive
380	6-methoxyquinoline	5263-87-6	Positive
381	methyl beta-phenylglycidate	37161-74-3	Positive
382	4-methyl-2-pentenal	5362-56-1	Positive
383	2-methylquinoline	91-63-4	Positive
384	2-[(methylthio)methyl]-2-butenal	40878-72-6	Positive
385	ethyl maltol	4940-11-8	Equivocal
386	2-hydroxy-1,2-diphenylethanone	119-53-9	Equivocal
387	3-propylidene-phthalide	17369-59-4	Equivocal
388	4,5-Dihydro-2,5-dimethyl-4-oxofuran-3-yl butyrate	114099-96-6	Positive
389	2-mercaptopinane	23832-18-0	Negative
390	2-methyl-2-butanethiol	1679-09-0	Negative

国立衛研・変異遺伝部が食検費で行った試験（H29まで）36化合物

H30年度試験化合物（食検費含む）10化合物

R1年度試験化合物 3化合物

未判定 3化合物

令和1年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究課題名：QSAR試験、Ames試験、哺乳類細胞を用いる遺伝子変異試験から得られる変異原性の比較

分担研究者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

昨年度、本班の厚生労働科学研究課題において、2つのQSARモデル（Derek Nexus (DN), Case Ultra (CU))を用いてAmes変異原性が強く疑われた10種類の食品香料について、実際のウェットなAmes試験を実施したところ、9化合物で陽性を示し、QSARによる変異原性香料物質の陽性予測率は90% (9/10)と評価された。一方、そのDNとCUモデルの予測結果が互いに異なる、或いは実際のAmes試験結果がそれらのQSAR結果と異なるものが3物質あった。そこで本研究では、これらの3物質（3-Acetyl-2,5-dimethylfuran、4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone、2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone）について、上位試験であるヒト培養細胞を用いるチミジンキナーゼ遺伝子（TK）変異試験を実施することによって、*in silico*のQSARモデルと細菌を用いるAmes試験の両結果と比較し、TK変異試験の有用性を考察することを目的とする。TK変異試験を実施した結果、3-Acetyl-2,5-dimethylfuran（DN; equivocal、CU; 陽性、Ames; 陽性）は陽性、2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone（DN; 陽性、CU; 陰性、Ames; 陰性）は陰性であり、QSAR解析やAmes試験と結果判定が一致した。一方、4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone（DN; 陽性、CU; 陰性、Ames; 陽性）は、TK変異試験では陰性と判定した。以上のことから、TK変異試験は、精度が良く信頼性の高い試験であること、そしてQSAR試験のCUモデルの結果と最も一致することが分かった。得られたデータは、QSAR予測性の向上、および専門家判断のための重要な遺伝毒性評価データとして資すると考えられる。

キーワード：ヒト細胞、チミジンキナーゼ遺伝子変異試験、Ames試験、QSAR

A. 研究目的

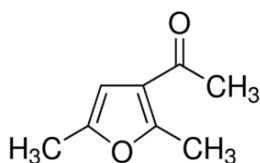
昨年度、本班の厚生労働科学研究課題において、2つのQSARモデル（Derek Nexus, Case Ultra）を用いてAmes変異原性が強く疑われた10種類の食品香料について、実際のウェットなAmes試験を実施したところ、9化合物で陽性を示し、QSARによる変異原性香料物質の陽性予

測率は90% (9/10)と評価された。この結果は香料の変異原性評価にQSAR手法が十分に利用できることを示した。

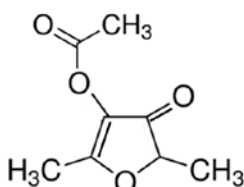
一方、そのDerek NexusとCase Ultraモデルの予測結果が互いに異なる、或いは実際のAmes試験結果がそれらのQSAR結果と異なるものが3物質あった（表1、図1）。4-Acetoxy-2, 5-

dimethyl-3(2H)-furanone と 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone は、酷似した構造を持っているが、Ames 試験結果は前者が陽性、後者が陰性である。一般的に、メトキシ基の方が変異原性増強アラートを有していると考えられるため、この結果は矛盾している。すなわち、フラン類の変異原性の予測と評価には高度の専門家判断が必要と考えられる。

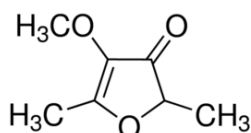
そこで本研究では、これらの3物質について、上位試験であるヒト培養細胞を用いるチミジンキナーゼ遺伝子 (*TK*) 変異試験を実施することによって、*in silico* の QSAR モデルと細菌を用いる Ames 試験の両結果と比較し、*TK* 変異試験の有用性を考察することを目的とする。それらの得られたデータは、QSAR 予測性の向上、および専門家判断のための重要な遺伝毒性評価データとして資すると考えられる。



3-Acetyl-2,5-dimethylfuran
(Cas; 10599-70-9)



4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone
(Cas; 4166-20-5)



2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone
(Cas; 4077-47-8)

図 1. 被験物質の化学構造式

B. 研究方法

1. 細胞と培養

ヒトリンパ芽球細胞 TK6 株は、10% 馬血清 (JRH Bioscience), 200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム (和光純薬工業株), 100 U/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン (ナカライテスク株) を含む RPMI 培地 (ナカライテスク株) で培養した。培養は、37 度、5% CO₂ 濃度存在下で行った。

2. 被験物質

3-Acetyl-2,5-dimethylfuran (Cas; 10599-70-9) と 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone (Cas; 4077-47-8) は東京化成工業株式会社、4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Cas; 4166-20-5) は富士フィルム和光純薬工業株式会社から購入した。

3. ヒト細胞 TK6 株を用いる *TK* 変異試験

TK 変異試験は、原則として OECD ガイドライン (TG490) に従って行った。用量設定試験から始め、本試験の順に実施した。処理細胞数は 10⁷ 細胞、処理時間は 4 時間、陽性対照物質は、メチルメタンサルフォネート (東京化成工業株式会社) を使用した。使用する被験物質は、非代謝活性化条件下で Ames 試験陽性になるため、本研究では代謝活性化条件下の試験は行わなかった。*TK* 変異試験の本試験の陰性対照群は 2 系列、処理群は 1 系列で実施した。形質発現期間は 3 日間とした。結果判定のための統計解析は、大森法 (Omori et al., *Mutat. Res.* 517,199-208 (2002)) を用いた。

C. 研究結果、および考察

1. *TK* 変異試験

1-1) 3-Acetyl-2,5-dimethylfuran

3-Acetyl-2,5-dimethylfuran の試験結果を図 2 に示した。1 回目の試験では、最大濃度を 2000 µg/mL として公比 3 で相対的細胞生存率 (Rel

ative Survival ; RS) を明らかにした。用量 666.7 $\mu\text{g/mL}$ のときに RS が 13.8 %であった。OEC D ガイドラインの規定通り RS = 10~20 % のときの用量を得ることができたため、引き続き TK 変異試験を実施した。その結果、用量 2000 $\mu\text{g/mL}$ では細胞毒性が強く試験続行が不可能であったが、用量 666.7 $\mu\text{g/mL}$ では TK 変異頻度が 8.3×10^{-6} であることが分かった。その値は、未処理群のそれと比較して、明らかに増加しているが、666.7 $\mu\text{g/mL}$ の用量群だけ増加しており明確な陽性と言えないため再試験を実施した。

2 回目の試験は、981.7 $\mu\text{g/mL}$ を最大濃度として公差 200 で実施したところ、581.7 $\mu\text{g/mL}$ のときに、RS が 19.1 %であった。TK 変異頻度を測定した結果、181.7、381.7、581.7 $\mu\text{g/mL}$ の用量依存的に変異頻度が増加した。統計解析をした結果、本試験は陽性であった。

表 1 に示した通り、3-Acetyl-2,5-dimethylfuran は、Ames 試験で陽性である。前年度の本間研究代表者の平成 30 年度厚労科研費報告書によると TA100 の+/-S9、WP2uvrA の-S9、TA98 の-S9 で陽性であり、TA100 の-S9 条件下の時に最大比活性値を示し 1281 revertants/mg (強い陽性) である。QSAR 試験においても明らかに陽性判定となっている。本研究で行った TK 変異試験においても明らかな陽性を示したように、既報の Ames 試験と QSAR 試験の陽性結果と一致した。3-Acetyl-2,5-dimethylfuran は、Ames 試験において比活性値 1000 revertants/mg を超える強い変異原性を有するため、3 つ全ての試験系で陽性を示したものと考えられる。

Ames 試験において塩基置換型の TA100、WP2uvrA 株、およびフレームシフト型の TA98 株を使用したときに陽性になっていることから、DNA 付加体の形成が疑われる。しかしながら、PubMed 等で 3-Acetyl-2,5-dimethylfuran の DNA 付加体に関する情報は無かった。

1 - 2) 4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone

4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone の結果を図 3 に示した。1 回目の試験では、最大濃度を 1701.6 $\mu\text{g/mL}$ として公比 3 で RS を測定した。用量 567.2 $\mu\text{g/mL}$ では RS が 62.8 %であったが、用量 1701.6 $\mu\text{g/mL}$ のときは、急に細胞毒性がすすみ、RS が 7.4 %に低下した。RS = 10~20 % 付近の至適濃度を定めるために、その用量間で再試験を実施することにした。なお、最高濃度 1701.6 $\mu\text{g/mL}$ の RS 値が 10 %以下 (7.4 %) だったため、正確な TK 変異頻度データとして採用しなかった。

2 回目の再試験のため、1701.6 $\mu\text{g/mL}$ を最大濃度として公差 200 で試験を行った。その結果、用量 1301.6、1501.6 $\mu\text{g/mL}$ の群で、RS が約 20 % であることが分かった。次に、その 1501.6 $\mu\text{g/mL}$ を最大濃度として TK 変異頻度を明らかにした。その結果、701.6 $\mu\text{g/mL}$ からの各処理群の TK 変異頻度は、未処理群のそれよりも上昇し、統計解析では陽性判定であった。しかしながら、未処理群の TK 変異頻度が 1.4×10^{-6} であり、今回の試験はこれまでの TK 変異頻度背景データの中でも非常に低かった。また、701.6~1501.6 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量において、 $2.7 \sim 4.7 \times 10^{-6}$ の TK 変異頻度を推移し、この幅広い用量域において用量依存的に TK 変異頻度の上昇がなかった。以上の 2 点を根拠として、本試験は陰性と判定した。

表 1 に示した通り、4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone は、Ames 試験で陽性である。前年度の本間研究代表者の平成 30 年度厚労科研費報告書によると、TA100 の+/-S9 で陽性であり、最大比活性値は 77 (TA100 の+S9) である。つまり、前述の 3-Acetyl-2,5-dimethylfuran よりも 4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone は、弱い陽性であり、さらに本研究で実施する非代謝活性化条件下 (-S9) では、さらに弱い陽性であると考えられる。QSAR 解析でも Derek Nexus で陽性であるが、Case Ultra で陰性と判定されて

いる (表 1)。本研究で行った TK 変異試験においても、高用量域は、未処理群の TK 変異頻度よりごくわずかに増加している傾向が見受けられるため、明らかに陽性ではない。前述の通り、統計解析では陽性だが、TK 変異頻度データを詳細にみると未処理群のそれが非常に低いことと用量依存性が無かったことから総合的判断として陰性と判定した。本物質は、TK 変異試験結果と Ames 試験結果が異なる結果となったが、バクテリア特異的な代謝反応等によって陽性になることが原因として考えられるが、現段階では分からない。4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone の Ames 試験陽性が比較的弱いこと、そして TK 変異試験もわずかであるが陽性の傾向があることから、陰性と陽性の境界にあると考えられる。TK 変異試験の 24 時間処理を実施すると陽性になるかもしれない。

1 - 3) 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone
2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone の結果を図 4 に示した。最大濃度を 1421.5 µg/mL とし公比 3 で RS を測定した。用量 17.5~1421.5 µg/mL の各用量では RS がおよそ 80 % を推移し、それ以上の細胞毒性は観察されなかった。したがって、TK 変異試験は最大濃度を 1421.5 µg/mL とし引き続き実施した。その結果、最大濃度 1421.5 µg/mL であっても、TK 変異頻度は、未処理群のそれよりも上昇せず、陰性と判定された。

表 1 に示した通り、2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone は、Ames 試験で陰性である。QSAR 試験においては Derek Nexus で陽性であるが、Case Ultra で陰性と判定されている (表 1)。本研究で行った TK 変異試験においても明確な陰性を示したように、既報の Ames 試験と QSAR 試験 (Case Ultra) の結果と一致した。

D. 結論

本研究によって得られた 3-Acetyl-2,5-dimethyl-

lfuran、4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone、そして 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone の 3 種のフラン類について、上位試験であるヒト培養細胞を用いる TK 変異試験を実施し、その結果を表 2 に示した。TK 変異試験は、Ames 試験と QSAR 試験の陽性物質に対して陽性と判定した。また、TK 変異試験は、Ames 試験と QSAR 試験 (Case Ultra) の陰性物質に対して陰性と判定した。以上のことから、TK 変異試験は、精度が良く信頼性の高い試験であること、そして QSAR 試験の Case Ultra モデルの結果と最も一致することが分かった。得られたデータは、QSAR 予測性の向上、および専門家判断のための重要な遺伝毒性評価データとして資すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sassa A, Fukuda T, Ukai A, Nakamura M, Takabe M, Takamura-Enya T, Honma M, Yasui M. Comparative study of cytotoxic effects induced by environmental genotoxins using XPC- and CSB-deficient human lymphoblastoid TK6 cells. Genes Environ. 41 :15 (2019). doi: 10.1186/s41021-019-0130-y.

2. 学会発表

1) 安井学, 福田隆之, 鶴飼明子, 馬庭二郎, 山本春菜, 今村匡志, 藤島沙織, 大谷尚子, 成見香瑞範, 松崎香織, 岡田祐樹, 中川宗洋, 上田摩弥, 三崎健太郎, 足立淳, 小川久美子, 本間正充: Ames 陽性を示す 10 化学物質のフォローアップに関する TK 遺伝子変異試験の有用性の検討: MMS 共同研究の報告. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会 (2019.11.18)

2) 竹入章, 松崎香織, 田中健司, 小川久美子, 安井学, 本間正充, 三島雅之: TK6 細胞にお

ける γ H2AX 評価は Ames 試験陽性の初期フォローアップとして有用である: MMS 共同研究追加項目. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会(2019.11.20)

- 3) 山本美佳, 大谷尚子, 安井学, 小川久美子, 本間正充: Ames 試験陽性のフォローアップとしての *in vitro* Comet assay の有用性の検討: MMS 共同研究オプション試験. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会(2019.11.18)

G. 知的所有権の取得状況

なし

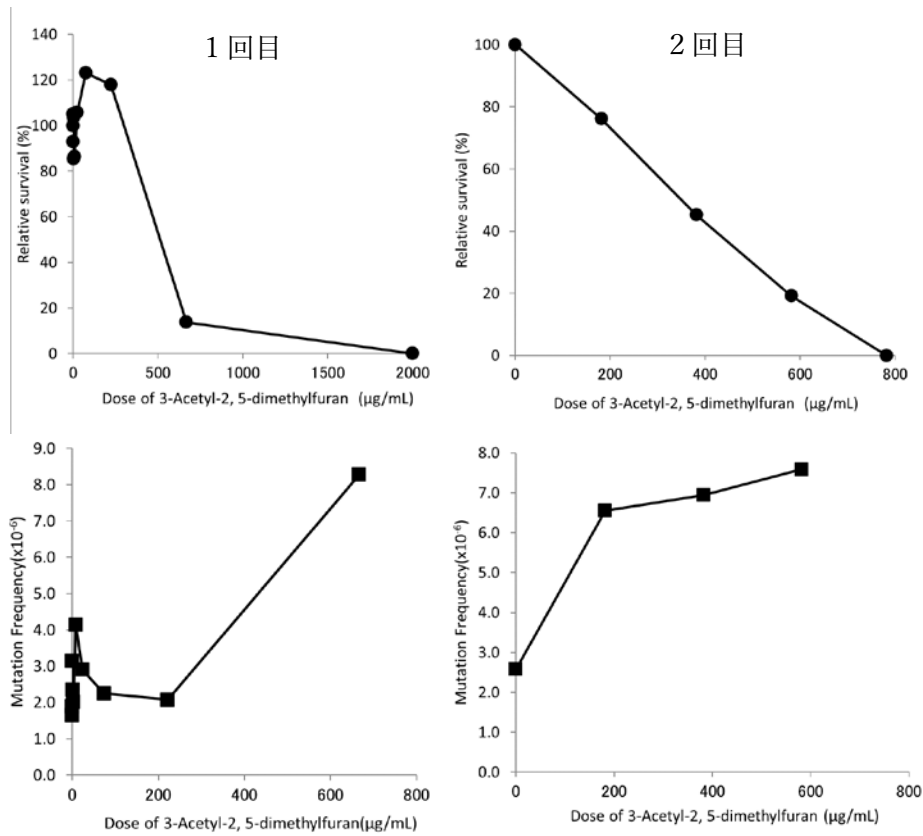


図2. 3-Acetyl-2,5-dimethylfuran の TK 変異試験結果

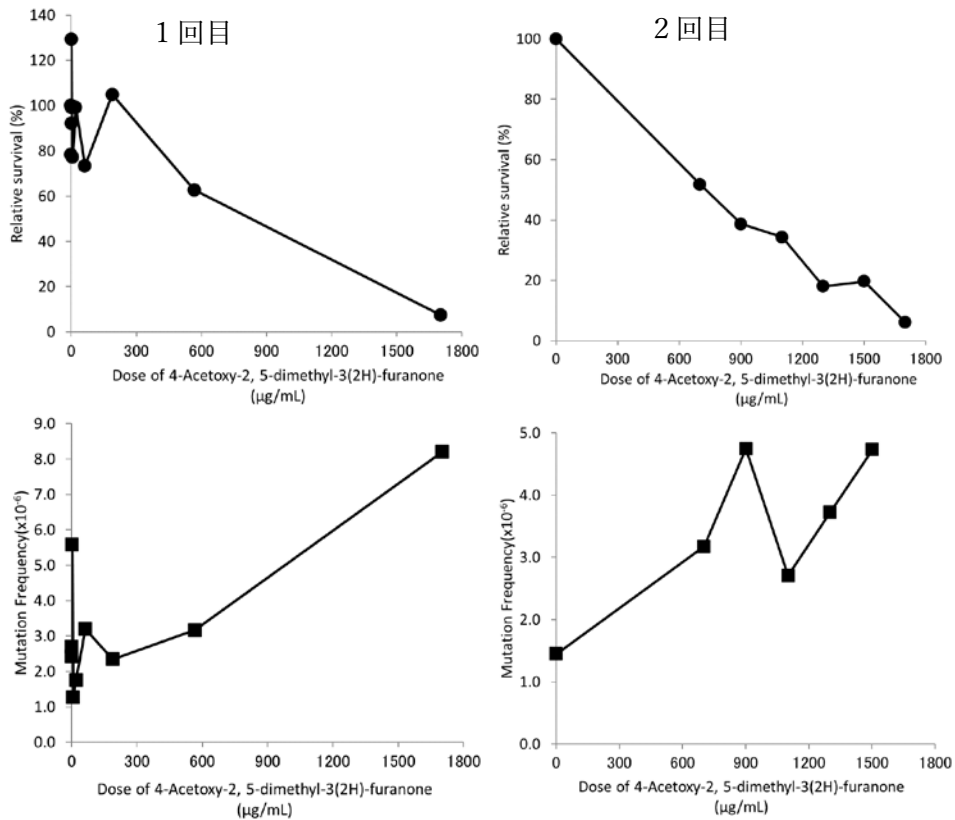


図3. 4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone の TK 変異試験結果

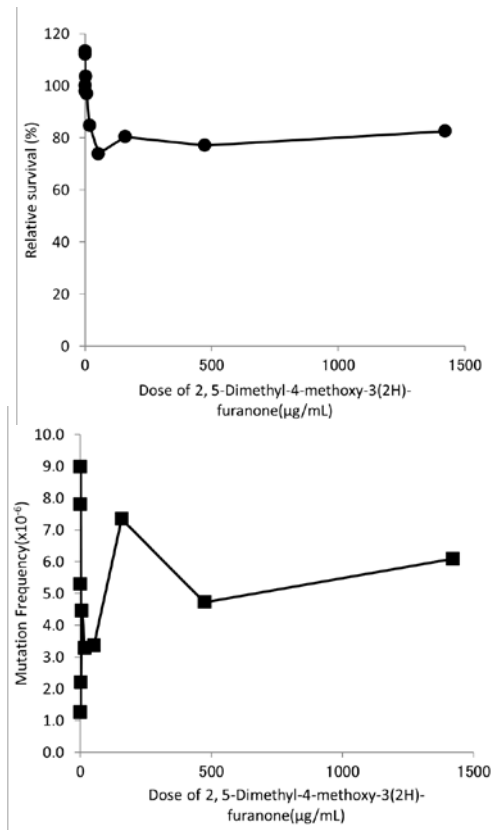


図 4. 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone の TK 変異試験結果

表1. QSAR 試験と Ames 試験の結果*

	QSAR		Ames 試験
	Derek Nexus	Case Ultra	
3-Acetyl-2,5-dimethylfuran (Cas; 10599-70-9)	Equivocal	Positive	Positive
4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Cas; 4166-20-5)	Plausible (Positive)	Negative	Positive
2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone (Cas; 4077-47-8)	Plausible (Positive)	Negative	Negative

*前年度の本間研究代表者の平成 30 年度厚労科研費報告書から引用

表2. ヒト培養細胞を用いる TK 変異試験との比較

	QSAR*		Ames 試験*	ヒト培養細胞 を用いる TK 変異試験
	Derek Nexus	Case Ultra		
3-Acetyl-2,5-dimethylfuran (Cas; 10599-70-9)	Equivocal	Positive	Positive	Positive
4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Cas; 4166-20-5)	Plausible (Positive)	Negative	Positive	Negative
2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone (Cas; 4077-47-8)	Plausible (Positive)	Negative	Negative	Negative

*前年度の本間研究代表者の平成 30 年度厚労科研費報告書から引用

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

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

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

研究分担者：増村健一 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第三室 室長
協力研究者：安東朋子 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法（AOP）」を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指すとともに、遺伝毒性の定量的な評価を試みる。食品に含まれる遺伝毒性発がん物質であるアクリルアミド（AA）をモデル化合物として、DNA 初期損傷（DNA 付加体形成）と遺伝子突然変異の量的相関を明らかにするため、雄 *gpt delta* マウスを用いたトランスジェニック遺伝子突然変異試験を行った。AA を 300, 100, 30 ppm の用量で 28 日間飲水投与した。肝臓における *gpt* 突然変異体頻度は AA 投与群で陰性対照群の約 3 倍に増加したが、3 用量群ではほぼ同程度の変異体頻度を示し、用量依存性は明確でなかった。肝臓において AA の DNA 付加体量が投与量に依存して増加するのに対して、遺伝子突然変異の頻度は低用量群（30 ppm）で有意に増加するがそれ以上の用量では頭打ちの用量反応性を示すことから、遺伝毒性発がん AOP において、分子的初期イベント（DNA 付加体形成）と下流のキーイベント（遺伝子突然変異誘発）が定性的に相関するが、用量反応性が異なる特徴を示す場合があることが示唆された。遺伝毒性と発がん AOP の研究において発がん試験データが豊富なラットを用いた試験が重要だが、従来の *gpt delta* ラットはレポーター遺伝子の回収効率が低く実験コストが高い欠点があった。この問題を克服するため、トランスジーン λ EG10 の導入コピー数が多く、かつホモに持った新規 *gpt delta* ラットの評価を行った。Wistar Hannover 系統の新規 *gpt delta* ラットは従来の λ EG10 ヘテロ F344 系統と比較して約 5 倍高い回収効率が得られたことから、ラットを用いた TGR 試験の効率化が期待できる。

キーワード: 遺伝子突然変異, アクリルアミド, *gpt delta* マウス, *gpt delta* ラット

A. 研究目的

本研究では、香料等化学物質の安全性を階層的に評価する評価系を構築し、食品香料等の効率的かつ信頼性の高い安全性評価の推進に資することを目的とする。OECD が提唱する「化学物質

と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法（AOP）」を取り入れた遺伝毒性評価系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。化学発がんの分子的初期イベントである DNA 初期損傷

(DNA 付加体形成) およびこれに続くキーイベントである遺伝子突然変異誘発に関して、これらの *in vivo* における量的相関を明らかにするため、トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験 (TGR 試験) を行う。食品に含まれる遺伝毒性発がん物質であるアクリルアミド (AA) をモデル化合物として、*gpt delta* マウスを用いた飲水投与実験を実施した。昨年度は体組織における DNA 付加体形成量を測定した。今年度は TGR 試験によって遺伝子突然変異頻度を測定し、用量反応関係を比較する。また、AOP を考慮した TGR 試験の実施においては、発がん試験データが豊富なラットを用いた試験も重要だが、従来の *gpt delta* ラットはマウスと比べてゲノム中のトランスジーンのコピー数が少ない上、トランスジーンをヘテロに持つため、実験コストが高い欠点があった。この問題を克服するため、導入コピー数を増やしてレポーター遺伝子の回収効率を高めた新規 *gpt delta* ラットの作出と評価を行う。

B. 研究方法

1. AA 飲水投与実験

アクリルアミド (CAS 79-06-1, MW=71.08) (純度 99%, Sigma-Aldrich) を Milli-Q 水に溶解して 300, 100, 30 ppm 溶液に調製し、雄 9 週齢の *gpt delta* マウス (C57BL/6J) に 28 日間飲水投与した。(AA 100 ppm は 1.4 mM に相当する。) 1 群 10~11 匹のマウスを用いた。各群 5 匹を DNA 付加体測定および遺伝子突然変異試験用として、投与終了後 3 日目に安楽死させて組織 (肝臓、肺、精巣) を採取し、-80°C で凍結保存した。さらに投与終了後 100 日目に各群 5~6 匹を安楽死させて同様に組織を採取し凍結保存した。

2. 遺伝子突然変異頻度の測定

AA 投与個体の組織からゲノム DNA を調製して *gpt* 遺伝子突然変異体頻度を測定した。肝臓、肺、精巣から RecoverEase DNA Isolation Kit (Agilent) を用いて長鎖 DNA を調製した。Transpack packaging extract (Agilent) を用い

て λ *in vitro* パッケージングによりゲノム DNA 中のトランスジーン λ EG10 を λ フェージとして回収した。回収した λ フェージを Cre 組換え酵素を発現する大腸菌 YG6020 株に感染させると、 λ EG10 DNA 中のレポーター遺伝子を含む領域が Cre-lox 組換え反応によって切り出され、マルチコピーのプラスミドとして保持される。プラスミド上には変異検出のレポーター遺伝子である大腸菌 *gpt* 遺伝子とクロラムフェニコール (Cm) 耐性遺伝子が存在する。*In vitro* パッケージングで回収したフェージを YG6020 に感染させ、6-チオグアニン (6-TG) と Cm を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で 4 日間培養し、6-TG 耐性コロニー数をカウントした。また、Cm を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で 3 日間培養し、総形質転換コロニー数をカウントした。6-TG 耐性コロニー数を総形質転換コロニー数で除して突然変異体頻度を算出した。AA 飲水投与実験の肝臓 (最終投与 3 日後及び 100 日後) を用いて *gpt* 突然変異体頻度の用量反応データを取得した。

3. 新規 *gpt delta* ラットのレポーター遺伝子の回収効率の評価

λ EG10 フェージの液体 lysate からフェージ DNA を調製した (QIAGEN)。 λ EG10 DNA を Wistar Hannover ラット受精卵にマイクロインジェクションし、産仔について PCR で λ EG10 のゲノムへの導入を検索し、導入が確認された個体については交配して λ EG10 をホモに持った系統を作出した (SLC 社が実施)。新規 *gpt delta* ラット候補のラインについて、導入遺伝子の回収効率 (パッケージング効率) の測定を実施した。肝臓組織から 2. と同様に長鎖 DNA を調製し、 λ *in vitro* パッケージングを行った。大腸菌 *E.coli*C 株に感染させ、 λ 寒天培地にまいて 37°C で一晩培養し、フェージプラーク数をカウントして 1 回のパッケージングあたりのプラーク数 (p.f.u.) を算出した。また、回収したフェージを YG6020 に感染させ、Cm を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で 3 日間培養し、総形質

転換コロニー数をカウントした。2つのラインについてパッケージング効率を測定し、従来の *gpt delta* ラット (F344, λ EG10 ヘテロ) と比較した。

(倫理面への配慮)

マウスの実験は国立医薬品食品衛生研究所の動物実験の適正な実施に関する規程を遵守し、動物実験委員会の審査と承認を受けて実施した。ラットの実験は実施機関 (SLC) の規程を遵守し、動物実験委員会の審査と承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1. AA 飲水投与実験

雄 *gpt delta* マウスに AA を 28 日間飲水投与した。300 ppm 群において投与 1 週目以降に体重増加抑制がみられ、投与 2~4 週目は 0 ppm 群と比較して有意な体重増加抑制が認められた。最終投与の 3 日後および 100 日後に組織を採取し凍結保存した。最終投与 3 日後の体重、肝臓および肺の絶対重量は全群で有意な変化がなかったが、300 ppm 群において精巣重量が 0 ppm 群と比較して有意に減少した。最終投与 100 日後では全群に差は認められなかった。

2. 遺伝子突然変異頻度の測定

AA28 日間投与後 3 日目の肝臓において、0, 30, 100, 300 ppm 群の *gpt* 突然変異体頻度はそれぞれ $4.2 \pm 2.3 \times 10^{-6}$ 、 $12.4 \pm 6.8 \times 10^{-6}$ 、 $14.0 \pm 4.9 \times 10^{-6}$ 、 $14.2 \pm 5.2 \times 10^{-6}$ であった (各群 5 匹の平均値 \pm SD)。3 投与群において陰性対照群と比較して変異頻度の有意な増加がみられた

($p < 0.05$, Dunnett's test)。最終投与 100 日後の肝臓における *gpt* 突然変異体頻度は 0, 30, 100, 300 ppm 群でそれぞれ $9.0 \pm 4.4 \times 10^{-6}$ 、 $23.4 \pm 6.9 \times 10^{-6}$ 、 $18.5 \pm 9.1 \times 10^{-6}$ 、 $19.3 \pm 2.7 \times 10^{-6}$ であった (各群 5~6 匹の平均値 \pm SD)。3 投与群において陰性対照群と比較して変異頻度の有意な増加がみられた ($p < 0.05$, Dunnett's test)。また、全群において、投与後 3 日目と比較して突

然変異頻度は高値を示した。AA 飲水量から換算した AA 投与量に対して *gpt* 突然変異体頻度をプロットしたグラフを図 1 に示した。最終投与 3 日後および 100 日後のいずれにおいても、変異体頻度は 30 ppm 群で有意に増加し、100, 300 ppm 群では 30 ppm 群とほぼ同様の値を示し、プラトー様の用量反応曲線を示した。

3. 新規 *gpt delta* ラットのレポーター遺伝子の回収効率の評価

新規 *gpt delta* ラット候補ラインのレポーター遺伝子回収効率を測定した。 λ EG10 遺伝子のゲノム中への導入が PCR で確認された個体から、交配によって導入遺伝子をホモに持つ系統を作出した。候補 2 系統 (ライン 1、ライン 2) について、それぞれ 3 個体を用いて肝臓 DNA を調製し、各 DNA 10 μ L を使用して λ *in vitro* パッケージングを行った。*E.coli*C および YG6020 を用いてパッケージング効率 (1 回のパッケージングで回収されたファージプラーク数または形質転換コロニー数) を測定した。各個体サンプルについて 3 回測定を行った。結果を図 2 に示した。*E.coli*C を用いたパッケージング効率は、新規ライン 1 で $3.9 \pm 0.8 \times 10^5$ 、ライン 2 で $8.0 \pm 0.2 \times 10^5$ 、従来の F344 ヘテロ系統で $1.0 \pm 0.7 \times 10^5$ であった (各群 3 匹の平均値 \pm SD)。従来の *gpt delta* ラットと比較して、新規ライン 1 では約 3 倍、ライン 2 では約 5 倍の高い回収効率が得られた。また、YG6020 を用いたパッケージング効率は、ライン 1 で $3.9 \pm 1.4 \times 10^5$ 、ライン 2 で $7.6 \pm 0.9 \times 10^5$ であった (各群 3 匹の平均値 \pm SD)。ライン 1 と比較してライン 2 の方が 2 倍程度高い効率を示した。

D. 考察

ヒトおよびげっ歯類において、AA は肝臓のチトクローム P450 (CYP2E1) によってグリシドアミドに代謝された後、グリシドアミド DNA 付加体 (N7-dG-GA, N3-dA-GA, N1-dA-GA 等) を形成する。グリシドアミドのげっ歯類発がん試

験において AA と同等の投与量で同様の臓器に発がん性がみられており、AA の発がん AOP として、分子的初期イベントとして DNA へのグリシドアミド付加体の形成、キーイベントとして遺伝子突然変異の誘発を設定することができる。 *gpt delta* マウスを用いた AA の飲水投与実験を実施した。本実験では OECD が推奨する TGR 試験の標準的プロトコルに従い、28 日間投与の 3 日後に組織採取した。肝臓における *gpt* 突然変異体頻度は AA 投与群で陰性対照群の約 3 倍に増加したが、3 用量群でほぼ同程度の変異体頻度を示し、用量依存性は明確でなかった。一方、AA 投与量依存的に DNA 付加体 (N7-dG-GA) 量は直線的に増加することが昨年示されている。DNA 付加体と遺伝子突然変異頻度の用量相関性が異なる原因として、肝臓は細胞のターンオーバーが遅い臓器であることから、投与後 3 日目の時点では DNA 付加体が DNA 修復および複製を経て突然変異として固定される時間が十分でなかった可能性が考えられた。そこで、28 日間投与の 100 日後に採取した肝臓を用いて *gpt* 突然変異体頻度の測定を行った結果、突然変異体頻度は AA 投与群で陰性対照群の 2~3 倍に増加したものの用量依存性は明確でなく、投与後 3 日目と同様の結果が得られた。無処理群と投与群の最終投与 100 日後の変異体頻度はそれぞれ 3 日後と比較して高い値を示したことから、肝臓で突然変異が固定されるための発現時間は十分と考えられた。以上の結果から、肝臓において AA の付加体量が投与量に依存して増加するのに対して、遺伝子突然変異の頻度は低用量群 (30 ppm) で有意に増加するがそれ以上の用量では頭打ちの用量反応性を示すことが示唆された。遺伝毒性発がん AOP において、分子的初期イベント (DNA 付加体形成) と下流のキーイベント (遺伝子突然変異誘発) が定性的に相関する一方で、用量反応性が異なる特徴を示す場合があることが示唆された。AA の発がんメカニズムにおいて N7-dG-GA 付加体以外の要素が関与している可能性が考えられた。今後は、他の臓器に

についても用量反応データを取得し、BMD 法等を用いて遺伝毒性の定量的評価における異なるエンドポイントの比較を行う。

遺伝毒性と発がん AOP の研究においては発がん試験データが豊富なラットを用いた TGR 試験が重要だが、従来の *gpt delta* ラットはゲノム中のトランスジーンのコピー数が少なく、またトランスジーンをヘテロに持つため、レポーター遺伝子の回収効率が低く実験コストが高い欠点があった。この問題を克服するため、導入コピー数が多く、かつトランスジーンをホモに持った新規 *gpt delta* ラットの作出と評価を行った。Wistar Hannover 系統の λ EG10 ホモ化 *gpt delta* ラット 2 ラインを候補としてパッケージング効率を測定した結果、従来の F344 ヘテロ系統と比較して約 5 倍高い回収効率を得た。この結果は、ラットを用いた TGR 試験の効率化をもたらすものと期待される。より回収効率が高いライン 2 を選択し、今後は変異原物質 (ENU およびベンツピレン) 投与実験を実施して、突然変異頻度を測定し、変異原物質に対する感受性を確認する。

E. 結論

gpt delta マウスを用いた AA の 28 日間飲水投与実験を実施した。肝臓の *gpt* 突然変異体頻度は投与群で有意に増加したが、用量依存性が明らかでないという特徴を示した。ラットを用いた TGR 試験の効率化のため、従来の系統と比べてレポーター遺伝子回収効率が約 5 倍高い新規 *gpt delta* ラットの評価を行った。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoki Y, Matsumoto M, Matsumoto M, Masumura K, Nohmi T. Mutant frequency is not increased in mice orally

- exposed to sodium dichromate. Food Safety. 2019;7:2–10.
2. Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline in F344 *gpt* delta transgenic rats. *Mutagenesis*. 2019;34:279-287.
 3. Lynch AM, Eastmond D, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Marchetti F, Masumura K, Pacchierotti F, Schuler M, Tweats D. Targets and mechanisms of chemically induced aneuploidy. Part 1 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res*. 2019;847:403025.
 4. Pacchierotti F, Masumura K, Eastmond D, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Lynch AM, Schuler M, Tweats D, Marchetti F. Chemically induced aneuploidy in germ cells. Part II of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res*. 2019 Nov;848:403023.
 5. T Tweats D, Eastmond DA, Lynch AM, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Marchetti F, Masumura K, Pacchierotti F, Schuler M. Role of aneuploidy in the carcinogenic process: Part 3 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res*. 2019;847:403032.
 6. Hori H, Shimoyoshi S, Tanaka S, Momonami A, Masumura K, Yamada M, Fujii W, Kitagawa Y, Hayashi M. Multiple-endpoint genotoxicity assay for colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Mutat Res*. 2020;849:503130.
 7. Aoki Y, Taniguchi Y, Matsumoto M, Matsumoto M, Ohno M, Masumura K, Sasaki S, Tsuzuki T, Yamamoto M, Nohmi T. Oxidative-stress-driven in vivo mutagenesis induced by oral administration of potassium bromate in the small intestines of *gpt* delta mice. *Mutat Res*. 2020;850-851:503136.
2. 学会発表
1. Masumura K, Ando T, Ishii Y, Honma M: Dose response of DNA adduct formation and gene mutation induced by acrylamide in *gpt* delta mice. 50th annual meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS) (2019.09)
 2. Masumura K, Ando T, Toyoda-Hokaiwado N, Ukai A, Nohmi T, Honma M: Analyses of ENU-induced germ cell mutations in male mice and inherited germline mutations in the offspring. The 47th annual meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EEMGS) (2019.05)
 3. Masumura K, Ando T, Ukai A, Fujiwara S, Suzuki T, Yokose S, Takagi H, Nohmi T, Honma M: New strain of *gpt* delta transgenic rat is homozygous for transgene and highly improved packaging efficiency. The Joint Meeting of the 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) (2019.11)
 4. 増村健一 : Detection of *de novo* germline mutations in the offspring of mutagen-exposed male mice by whole exome/genome

sequencing. 日本放射線影響学会第 62 回大会 (2019.11)

H. 知的所有権の取得状況
なし

Comparison of dose response of *gpt* MF in the liver (28+3d vs 28+100d)

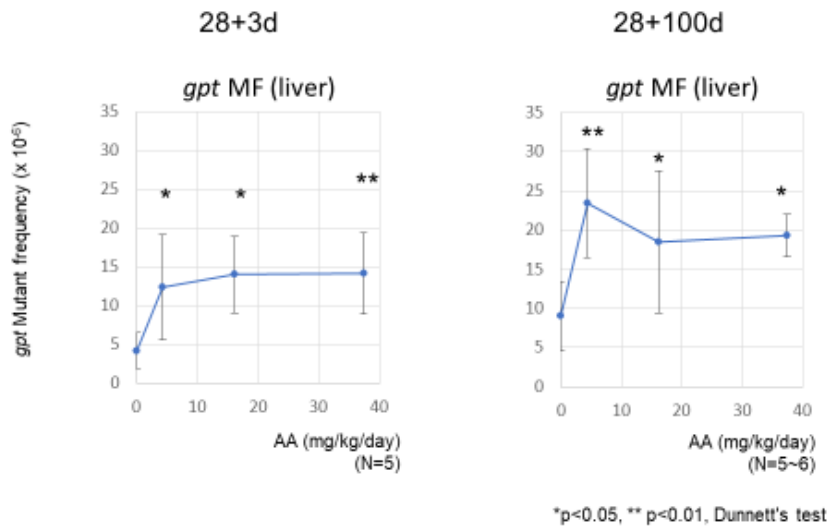


図1. AA 投与マウス肝臓における *gpt* 突然変異体頻度

Packaging efficiencies of new *gpt* delta rat (homo) candidates (E. coli C and YG6020)

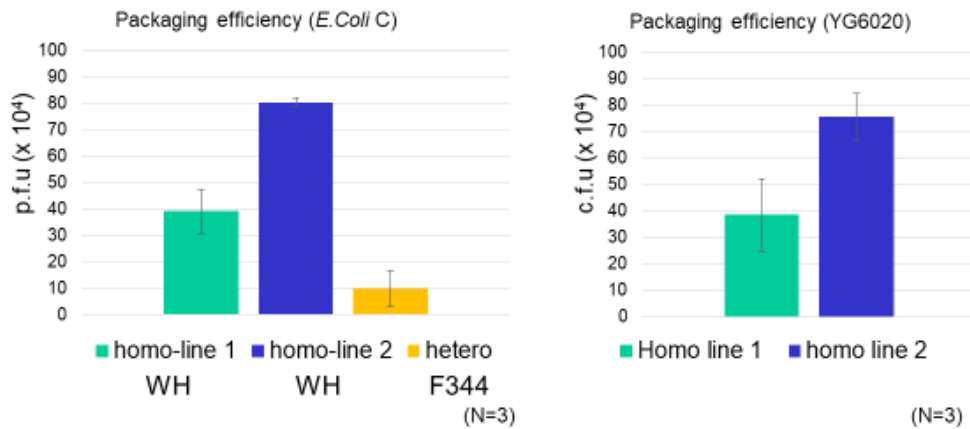


図2. 新規 *gpt* delta ラットのレポーター遺伝子の回収効率

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

研究要旨

食品香料として用いられていた acetamide はラット肝発がん性を有する。FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）は、その機序に遺伝毒性機序の関与が否定できないという理由から添加物としての使用は不適切としたものの、種々の遺伝毒性試験は陰性であることから、その関与は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、*gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験を用いて、acetamide の包括的評価を実施した。平成 30 年度に引き続き、acetamide を 0.625、1.25 および 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与した F344 系 *gpt delta* ラットについて、全身諸臓器の病理組織学的検索と発がん標的臓器である肝臓における遺伝毒性評価を実施した。肝臓では 1.25% から肝細胞の空胞化、核成分に由来する細胞質内封入体、核分裂像の増加、変異肝細胞巣等の変化が認められ、脾臓では 2.5% において赤芽球の減少が認められたことから、acetamide がラット肝臓および造血器系組織に毒性影響を及ぼすことが明らかになった。また、本試験における acetamide の無毒性量は 0.625%（394 mg/kg 体重/日に相当）と考えられた。遺伝毒性評価では、*gpt assay* および *Spi assay* とともに、いずれの投与群においても変異体頻度の変化は認められなかったことから、acetamide のラット肝発がん過程において突然変異誘発性の関与は乏しいと考えられた。

A. 研究目的

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

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

る必要がある。

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

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

平成 30 年度は用量設定試験の後、本試験として雄性 6 週令の *gpt delta* ラットに acetamide を 0.625、1.25 および 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与し、血液学的検査および血清生化学検査を実施した。その結果、肝

重量の低値、AST 及び ALT の有意な上昇は 1.25% から認められ、肝毒性が疑われた。本年度は、全身諸臓器の病理組織学的検査と肝臓における遺伝毒性評価を実施した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

Acetamide は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。

B-2. Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験

B-2-1 動物実験

動物は 5 週令の雄性 F344 系 *gpt delta* ラット 40 匹を日本エスエルシー株式会社（静岡）から購入し、一週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリヤーステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社（東京）のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飲料水として水道水を試験期間中自由に摂取させた。40 匹の F344 系 *gpt delta* ラットを各群 10 匹に配し、対照群と低用量、中間用量及び高用量群の計 4 群を設けた。Acetamide の投与は用量設定試験の結果に基づいて、高用量を 2.5%、中間用量、低用量群は公比 2 で除した 1.25%、0.625% とし、粉末飼料に混じり、13 週間自由摂取させた。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施し、体重及び摂餌量測定は週 1 回実施した。剖検の 16 時間前より絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。

B-2-2. 一般毒性評価

血液学的検査は、自動血球計数装置

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

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

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

B-2-3. 遺伝毒性評価

Acetamide の遺伝毒性評価として, 発がん標的臓器である肝臓を用いて *gpt* assay および *Spi* assay を実施した。

gpt assay では回収したファージ粒子を

大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては, 再度, 6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また, ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後 YG6020 株に感染させ, Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 遺伝子変異体頻度 (MFs) を算出した。また, 6-TG と Cm に耐性となったコロニーは Thermo Fisher Scientific 社製 3730x1 DNA Analyzer にて *gpt* 遺伝子の塩基配列解析を行い, 変異部位を同定した。

Spi assay による欠失変異の検出では, ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2)株) に感染させ, *Spi* プラークの候補については, さらに他の P2 溶原菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ, *redgam* 遺伝子機能が不活化した真の *Spi* プラークを検出した。また, パッケージ反応後の懸濁液を希釈した後に P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて, 総プラーク数を算出した。真の *Spi* プラーク数を回収した総プラーク数で除して *Spi* MF を算出した⁸⁾。

(倫理面への配慮)

動物実験は熟練者が実施し, 動物の苦痛を最小限に留めた。また, 動物はすべてイソフルラン麻酔下で大動脈からの脱血に

より屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。実験動物に関しては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組み換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

C. 研究結果

C-1. 一般毒性評価

全身諸臓器の病理組織学的検査の結果を Table 1 に示す。肝臓では、1.25%から肝細胞の空胞化、有糸分裂像の増加、単細胞壊死、好塩基性の細胞質内封入体、核の大小不同、オーバルセル過形成及び変異肝細胞巣が認められた。脾臓では、2.5%において赤芽球の減少が認められた。その他、種々の臓器で病理所見が散見されたが、いずれも統計学的に有意ではなく、自然発生性の変化と考えられた。

C-2. 遺伝毒性評価

肝臓を用いた *gpt* assay 及び *Sp1* assay の結果をそれぞれ Table 2 及び 3 に示す。いずれの投与群においても *gpt* 及び *Sp1* MFs の有意な変化は認められなかった。また、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラム解析を行ったものの、*acetamide* に投与による変異パターンの変化は認められなかった (Table 4)。

D. 考察

D-1. 一般毒性評価

肝臓の病理組織学的検査では、1.25%から単細胞壊死、オーバルセル過形成といった肝傷害性の変化が観察され、2.5%ではそれらの程度及び頻度が増加していた。これらの変化は、昨年度報告した血清生化学検査における肝毒性パラメーターの上昇と一致していた。また、肝細胞の空胞化は血清生

化学検査における TG の減少に関連した変化と考えられた。核成分に由来する細胞質内封入体も 1.25%から認められ、同群では有糸分裂像の増加および核の大小不同が高頻度に認められたことから、当該封入体は有糸分裂異常に関連した変化と考えられた。変異肝細胞巣については、令和 2 年度に実施する発がん性評価と合わせて考察する。

脾臓の病理組織学的検査では、2.5%で赤芽球の減少が認められた。当該変化は、血液学的検査における赤血球系パラメーターの変動に関連した変化と考えられた。

なお、0.625%では、血清生化学検査における TG の低値、及び血液学的検査における MCH の高値と好塩基球の低値が認められたが、いずれも軽微な変化であり、関連するパラメーターの変動や病理組織変化を伴っていなかったことから、毒性学的意義は乏しいと判断した。

D-2. 遺伝毒性評価

発がん標的臓器である肝臓における変異原性評価では、発がん用量である 2.5%においても *gpt* 及び *Sp1* MFs の変化は認められなかったことから、*acetamide* のラット肝発がんにおける突然変異誘発性の関与は乏しいと考えられた。一方、病理組織学的検査において肝臓で認められた細胞質内封入体は核成分に由来しており、小核とも類似していたことから、今後、同組織を用いた肝臓小核試験を実施し、肝臓における染色体異常の有無と肝発がん性との関連について検討する。

E. 結論

一般毒性試験において、*acetamide* は 1.25%から肝臓及び造血器系組織に毒性影響を示すことが明らかとなり、本試験における無毒性量は 0.625% (394 mg/kg 体重/日に相当) と考えられた。

また、発がん標的臓器である肝臓における遺伝毒性評価の結果、*acetamide* は *in vivo* においても変異原性を示さないことが明ら

かとなった。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究成果

G-1. 発表論文
なし

G-2. 学会発表

- 1) 中村賢志, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 石井雄二, 小川久美子「レポーター遺伝子導入動物を用いた包括的毒性試験法による acetamide の評価」第5回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2019年9月)
- 2) 中村賢志, 石井雄二, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「*gpt delta* ラットを用いた acetamide のラット肝発がんメカニズムに関する検討」第36回日本毒性病理学会学術集会 (2020年2月)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

参考文献

- 1) Suzuki Y, Umemura T, Hibi D, Inoue T, Jin M, Ishii Y, Sakai H, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa K. Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats. Arch. Toxicol. 86, 1593-1601 (2012).
- 2) Suzuki Y, Umemura T, Ishii Y, Hibi D, Inoue T, Jin M, Ssakai H, Kodama Y, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa, K. Possible involvement of sulfotransferase 1A1 in estragole-induced DNA modification and carcinogenesis in the livers of female mice. Mutat. Res. 749, 23-28 (2012).
- 3) Jin M, Kijima A, Suzuki Y, Hibi D, Inoue T, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa

K, Umemura T, Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with *gpt delta* rats. Toxicology, 290, 312-321.

- 4) Jin M, Kijima A, Hibi D, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kuroda K, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T, *In vivo* genotoxicity of methyleugenol in *gpt delta* transgenic rats following medium-term exposure. Toxicol. Sci. 131, 387-394.
- 5) JECFA : WHO Food Additives Series, Evaluation of Certain Food Additives, Report of 65th JECFA meeting, 2005
- 6) Diekmann J, Wittig A, Stabbert R, Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acrylamide and acetamide in cigarette mainstream smoke after on-column injection. J. Chromatogr. Sci., 46, 659-663 (2008).
- 7) Vismeh R, Haddad D, Moore J, Nielson C, Bals B, Campbell T, Julian A, Teymouri F, Jones AD, Bringi V, Exposure assessment of acetamide in milk, beef, and coffee using xanthidrol derivatization and gas chromatography/Mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 66, 298-305 (2018).
- 8) Nohmi T, Suzuki T, Masumura K. Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assay. Mutat. Res. 455, 191-215 (2000).

Table 1 Histopathological findings in F344 *gpt* delta rats given diet containing acetamide for 13 weeks.

Organs	Findings (\pm / $+$ / $++$ / $+++$)	Acetamide (%)			
		0	0.625	1.25	2.5
	No. of animals	10	10	10	10
Liver	Vacuolation, hepatocyte	0	0	10 (8/2/0/0)	10 (0/4/6/0)
	Single cell necrosis	0	0	8 (7/1/0/0)	10 (4/6/0/0)
	Oval cell hyperplasia	0	0	6 (6/0/0/0)	10 (3/7/0/0)
	Increased mitoses, hepatocyte	0	0	9 (6/3/0/0)	10 (1/9/0/0)
	Karyomegaly, hepatocyte	0	0	9 (5/4/0/0)	10 (0/10/0/0)
	Cytoplasmic inclusion, hepatocyte	0	0	10 (2/8/0/0)	10 (0/10/0/0)
	Foci of cellular alteration	0	0	3 (2/1/0/0)	10 (0/1/9/0)
	Necrosis, focal	0	0	0	1 (1/0/0/0)
Spleen	Decrease, erythroblast	0	0	0	7 (5/2/0/0)
Kidneys	Hyaline droplet	9 (9/0/0/0)	-	-	0
	Basophilic tubule	9 (9/0/0/0)	-	-	2 (2/0/0/0)
Harderian glands	Mononuclear cell infiltration	0	-	-	1 (1/0/0/0)
Heart	Degeneration/necrosis, cardiomyocyte	3 (3/0/0/0)	-	-	3 (2/1/0/0)
	Mononuclear cell infiltration	5 (4/1/0/0)	-	-	4 (4/0/0/0)
Lungs	Alveolar macrophage aggregation	1 (1/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)
	Osseous metaplasia	2 (2/0/0/0)	-	-	0
	Mineralization, pulmonary artery	2 (2/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)
Adrenals	Accessory adrenal gland	0	-	-	2
Epididymides	Mononuclear cell infiltration	1 (1/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)
Prostate	Atrophy, acinus	1 (1/0/0/0)	-	-	0
	Neutrophil infiltration	0	-	-	2 (2/0/0/0)
Salivary glands	Degeneration, acinar cell	0	-	-	1 (1/0/0/0)
Nasal cavity	Mineralization, epithelium	1 (1/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)
	Neutrophil infiltration, submucosa	0	-	-	1 (1/0/0/0)
Mediastinal lymph node	Deposit, brown pigment, sinus	1 (1/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)

Grade of change: \pm , minimal; +, slight; ++, moderate; +++, marked.

-: Not examined.

*, **: Significantly different from the 0% group at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively (Fisher's t-test).

Table 2 *gpt* MFs in the liver of F344 *gpt* delta rats given diet containing acetamide for 13 weeks.

Dose	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
0%	101	7.43	2 ^a	0.27	0.57 ± 0.53
	102	4.05	6	1.48	
	103	3.51	2	0.57	
	104	3.06	1	0.33	
	105	5.22	1	0.19	
0.625%	201	3.60	2	0.56	0.66 ± 0.42
	202	3.83	1	0.26	
	203	6.66	3	0.45	
	204	3.65	5	1.37	
	205	7.74	5	0.65	
1.25%	301	3.65	2	0.55	1.16 ± 0.64
	302	5.31	5	0.94	
	303	4.01	7	1.75	
	304	5.18	10	1.93	
	305	3.06	2	0.65	
2.5%	401	3.06	2	0.65	1.26 ± 0.70
	402	5.00	5	1.00	
	403	5.40	4	0.74	
	404	3.15	5	1.59	
	405	3.02	7	2.32	

^a: Number of colonies with independent mutations.

Table 3 Mutation spectra of *gpt* mutants in the liver of F344 *gpt* delta rats given diet containing acetamide for 13 weeks.

Dose	0%		0.625%		1.25%		2.5%	
	No. (%)	Specific mutation frequency (x 10 ⁻⁵)	No. (%)	Specific mutation frequency (x 10 ⁻⁵)	No. (%)	Specific mutation frequency (x 10 ⁻⁵)	No. (%)	Specific mutation frequency (x 10 ⁻⁵)
Base substitutions								
Transversions								
GC-TA	3 ^a (25.0)	0.13 ± 0.21	3 (18.8)	0.11 ± 0.12	4 (15.4)	0.18 ± 0.18	6 (26.1)	0.31 ± 0.08
GC-CG	0	0	0	0	2 (7.7)	0.09 ± 0.12	1 (4.3)	0.04 ± 0.08
AT-TA	0	0	0	0	0	0	2 (8.7)	0.13 ± 0.30
AT-CG	1 (8.3)	0.03 ± 0.06	0	0	0	0	0	0
Transitions								
GC-AT	5 (41.7)	0.26 ± 0.36	8 (50.0)	0.35 ± 0.43	10 (38.5)	0.49 ± 0.37	10 (43.5)	0.55 ± 0.14
AT-GC	0	0	1 (6.3)	0.03 ± 0.06	1 (3.8)	0.05 ± 0.11	1 (4.3)	0.04 ± 0.09
Deletion								
Single bp	2 (16.7)	0.10 ± 0.15	1 (6.3)	0.06 ± 0.12	6 (23.1)	0.23 ± 0.11	2 (8.7)	0.13 ± 0.18
over 2bp	1 (8.3)	0.05 ± 0.11	1 (6.3)	0.03 ± 0.07	1 (3.8)	0.05 ± 0.11	0	0
Insertion	0	0	2 (12.5)	0.08 ± 0.12	2 (7.7)	0.08 ± 0.17	1 (4.3)	0.06 ± 0.14
Complex	0	0	0	0	0	0	0	0

^a: Number of colonies with independent mutations.

Table 4 Spi⁻ MFs in the liver of F344 *gpt* delta rats given diet containing acetamide for 13 weeks.

Dose	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaque WL95 (P2)	withinMutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
0%	101	3.24	1	0.31	0.33 ± 0.13
	102	4.05	2	0.49	
	103	4.50	0	0.00 ^a	
	104	5.31	1	0.19	
	105	3.15	1	0.32	
0.625%	201	5.40	0	0.00 ^a	0.80 ± 0.36
	202	6.66	6	0.90	
	203	6.39	7	1.10	
	204	5.04	2	0.40	
	205	5.40	0	0.00 ^a	
1.25%	301	5.94	1	0.17	0.43 ± 0.27
	302	3.87	3	0.78	
	303	3.69	1	0.27	
	304	4.59	3	0.65	
	305	7.29	2	0.27	
2.5%	401	5.40	4	0.74	0.73 ± 0.43
	402	6.39	2	0.31	
	403	3.78	2	0.53	
	404	3.06	0	0.00 ^a	
	405	7.56	10	1.32	

^a: No mutant colonies were detected on the plate and this data was excluded from the calculation of mutant frequency.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究課題：肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価

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

研究要旨

本研究では、食品香料化学物質の安全性を *in silico*, *in vitro*, *in vivo* で階層的に評価する評価系を構築することを目的に、*in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物を対象として、遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法による *in vivo* での遺伝毒性・発がん性を検討する。本分担研究課題では、遺伝毒性が疑われる化合物としてリストアップされた候補化合物のうち、フラン環を基本骨格とする 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質とし、今年度は遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法による評価を実施するための用量設定試験を実施した。6週齢の雄性 F344 ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 60, 180 又は 540 mg/kg の濃度で 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。その結果、540 mg/kg/day 投与群では投与 1 週目から投与終了時まで有意な体重増加抑制がみられ、肝臓、腎臓、肺及び脾臓の相対重量は統計学的に有意な高値を示した。また、540 mg/kg/day 投与群では、投与 1 週目から全例で鼻出血が認められ、病理組織学的検査の結果、鼻腔嗅上皮の壊死が認められたことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran は、高用量では鼻腔粘膜を毒性標的とする可能性が示唆された。以上の結果を総合的に検討した結果、540 mg/kg/day では顕著な体重増加抑制が認められたことから、投与を継続できないと判断し、本試験の最高用量を 300 mg/kg/day に設定した。今後、遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の本試験を開始する予定である。

A. 研究目的

現在、食品香料として様々な化学物質が使用されているが、それらの生体影響については不明な点も多く、全ての香料の安全性が十分に担保されているとは言えない現状がある。本研究では香料化学物質の安全性を *in silico*, *in vitro*, *in vivo* で階層的に評価する評価系を構築し、食品香料の効率的且つ信頼性の高い安全性評価の推進に資することを目的とする。このうち、本分担研究課題では *in silico*, *in vitro* 試験において遺伝毒性が疑われる香料について *in vivo* 試験

系を用いて評価を行うことで、提唱する階層型試験系の開発に寄与することを目指す。

我々はこれまでに、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いて、個体レベルで遺伝毒性や発がん性を包括的に評価できるモデルを開発してきた。本研究では、本間、安井らの *in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物としてリストアップされた 10 候補化合物のうち、げっ歯類において肝発がん性を示すことが知られるフラン環を基本骨格とする香気成分である 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質として、遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法による *in vivo* での遺伝毒性・発がん性を明

らかにすることを目的とする。今年度は、遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法による評価を実施するための用量設定試験を実施した。

B. 研究方法

B-1. 試薬及び動物

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

B-2. 試験計画

6 週齢の雄性 F344 ラット各群 5 匹にコーン油に混じた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 60, 180 又は 540 mg/kg の濃度で 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。投与量は、昨年度に実施した 7 日間反復投与試験の結果に基づき設定した。投与終了後、剖検日前日より一晩絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、遠心分離した血清を凍結保存した。血清生化学的検査は、総タンパク (TP)、アルブミン・グロブリン比 (A/G)、アルブミン (Alb)、総ビリルビン (T. Bil)、グルコース (Glu)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-Cho)、リン脂質 (PL) 尿素窒素 (BUN)、クレアチン (CRN)、ナトリウム (Na)、塩素 (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (P)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニ

ントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスタファアーゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ (γ -GT) についてオリエンタル酵母工業株式会社（東京）にて測定した。剖検時に肝臓、腎臓、脾臓、肺、消化管および鼻腔を摘出し、肝臓、腎臓、脾臓及び肺に関しては、重量の測定を行った。さらに、摘出した臓器・組織について定法に従い病理組織学的検査を実施した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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

各群の体重推移と摂餌量を Figure 1 及び 2 に示す。540 mg/kg/day 投与群において、投与 1 週目から投与終了時まで統計学的に有意な体重増加抑制が認められた。また、540 mg/kg/day 投与群の摂餌量は対照群に比べて低い傾向が認められた。

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

血清生化学的検査の結果を Table 2 に示す。60 mg/kg/day 以上の投与群において、A/G の有意な上昇、Glu, TG, BUN 及び CRN の有意な低下が認められた。また、60 及び

180 mg/kg/day 投与群における T. Cho の有意な増加, 60 及び 540 mg/kg/day 投与群におけるナトリウムの有意な増加, 60 mg/kg/day 投与群における AST の有意な低下, 180 mg/kg/day 投与群における ALT の有意な増加が認められた。

病理組織学的検査の結果を Table 3 に示す。540 mg/kg/day 投与群の全例において, 鼻腔嗅上皮の壊死及び腎臓近位尿細管における hyaline droplet の減少が認められた。

D. 考察

in silico 解析結果から遺伝毒性が疑われた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran について, 遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法による *in vivo* での遺伝毒性・発がん性を検討することを目的に, 今年度は本試験を実施するための用量設定試験を実施した。

540 mg/kg/day を最高用量に, 180 又は 60 mg/kg/day の用量で 28 日間反復投与した結果, 540 mg/kg/day 投与群では投与 1 週目から投与終了時まで有意な体重増加抑制が認められ, 投与終了時では対照群に比して約 30% 減少した。このことから, 540 mg/kg/day では投与を継続できないと判断し, 本試験の最高用量を 300 mg/kg/day に設定した。今後, 遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の本試験を開始する予定である。

また, 540 mg/kg/day 投与群では, 投与 1 週目から全例で鼻出血及び紅涙が認められた。この症状は, 投与 3 週目以降には観察されなかったものの, 病理組織学的検査で鼻腔嗅上皮の壊死が認められたことから, 3-acetyl-2,5-dimethylfuran は, 高用量では鼻腔粘膜を毒性標的とする可能性が示唆された。

一方, 投与終了後の臓器重量を測定した結果, 540 mg/kg/day 投与群では肝臓, 腎臓, 肺及び脾臓の相対重量は統計学的に有意な高値を示した。また, 肝臓の相対重量は 180 mg/kg/day 投与群においても有意な高値を示したが, 投与に関連した病理組織学的変

化は認められなかった。血清生化学的検査の結果, 複数の検査項目で統計学的に有意な変化が認められたものの, 鼻腔粘膜以外の臓器・器官において毒性影響を示す病理組織学的変化がみられなかったことから, より長期間の投与による 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の毒性影響を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

in silico 解析結果から遺伝毒性が疑われた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran について, 遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法を実施するための用量設定試験を実施した。540 mg/kg/day を最高用量に 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 28 日間反復投与した結果, 540 mg/kg/day では顕著な体重増加抑制が認められたことから投与を継続できないと判断し, 本試験の最高用量を 300 mg/kg/day に設定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 発表論文

なし

G-2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

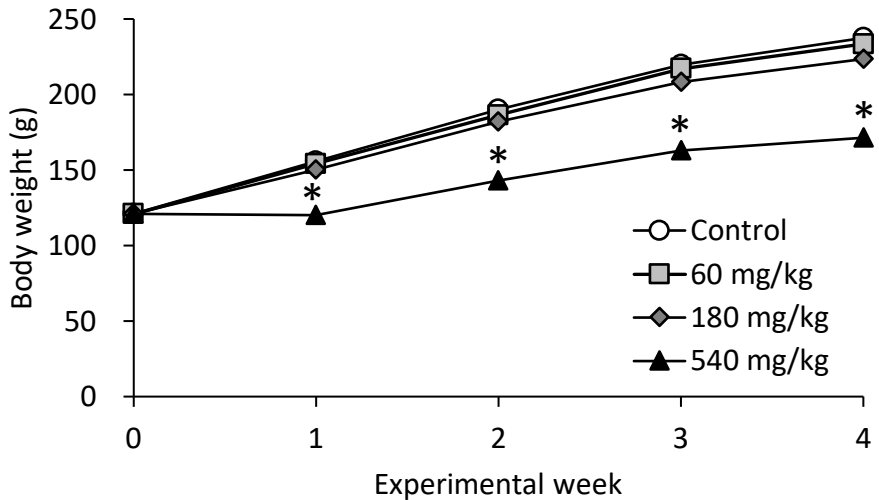


Figure 1. Body weights of male F344 rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 4 weeks.

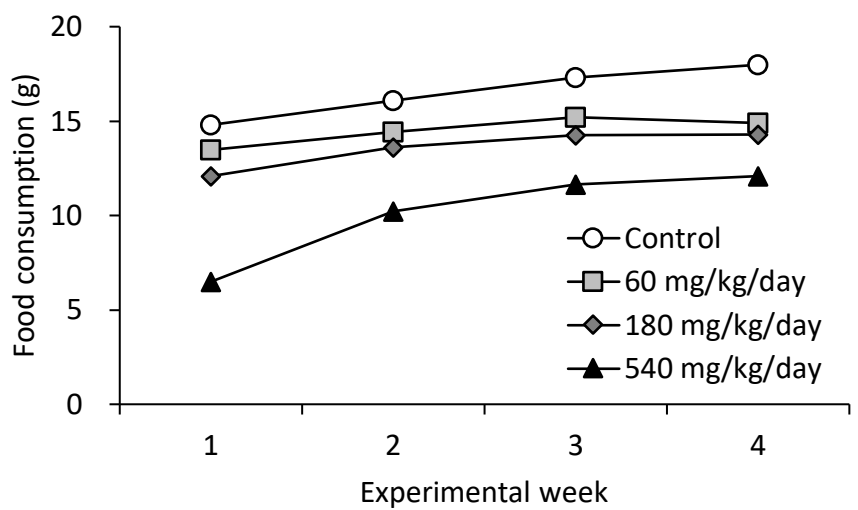


Figure 2. Food consumption of male F344 rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 4 weeks.

Table 1. Final body weight and organ weight data for male F344 rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 4 weeks.

	Control	60 mg/kg/day	180 mg/kg/day	540 mg/kg/day
Final body weights (g)	237.7 ± 12.8	233.4 ± 13.1	223.6 ± 8.5	171.6 ± 5.2 *
Organ weights				
Absolute weights (g)				
Lungs	0.82 ± 0.05	0.82 ± 0.04	0.81 ± 0.04	0.68 ± 0.02 *
Liver	7.30 ± 0.63	7.29 ± 0.58	7.67 ± 0.52	6.55 ± 0.35
Kidneys	1.48 ± 0.12	1.48 ± 0.13	1.56 ± 0.16	1.46 ± 0.08
Spleen	0.47 ± 0.02	0.45 ± 0.03	0.45 ± 0.02	0.38 ± 0.01 *
Relative weights (g/100g b.w.)				
Lungs	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.39 ± 0.01 *
Liver	3.07 ± 0.13	3.12 ± 0.08	3.43 ± 0.11 *	3.82 ± 0.09 *
Kidneys	0.62 ± 0.02	0.64 ± 0.03	0.70 ± 0.06	0.85 ± 0.03 *
Spleen	0.20 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.01 *

*: Values are significantly different from control at $p < 0.05$.

Table 2. Serum biochemistry for male F344 rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 4 weeks.

	Control	60 mg/kg/day	180 mg/kg/day	540 mg/kg/day
TP (g/dL)	6.1±0.1	6.1±0.1	6.0±0.2	5.8±0.3
A/G	2.6±0.1	2.9±0.1 *	3.1±0.2 **	3.4±0.2 **
Alb (g/dL)	4.4±0.1	4.5±0.1	4.5±0.1	4.5±0.2
T. Bil (mg/dL)	0.010±0.010	0.024±0.011	0.020±0.000	0.030±0.017
Glu (mg/dL)	173±5	152±5 **	142±11 **	126±4 **
TG (mg/dL)	114±21	78±18 **	46±10 **	18±4 **
T. Cho (mg/dL)	59±2	70±2 **	67±3 **	55±5
PL (mg/dL)	109±6	119±7	111±7	91±8 *
BUN (mg/dL)	21.6±1.8	19.1±0.8 *	17.3±1.0 **	16.5±1.3 **
CRN (mg/dL)	0.28±0.02	0.24±0.02 **	0.24±0.02 **	0.20±0.01 **
Ca (mg/dL)	10.1±0.2	10.2±0.2	10.2±0.2	10.1±0.3
P (mg/dL)	6.8±0.8	6.7±0.8	7.4±0.6	8.4±0.1 *
Na (mEq/dL)	142.2±0.8	143.6±0.5 **	143.2±0.4	144.0±0.7 **
K (mEq/dL)	4.2±0.2	4.3±0.2	4.3±0.2	4.3±0.2
Cl (mEq/dL)	101.2±1.1	102.2±0.4	101.6±1.1	102.2±1.3
AST (IU/L)	76±6	67±5 *	70±3	71±4
ALT (IU/L)	43±2	48±5	50±2 *	38±4
ALP (IU/L)	886±31	904±42	898±83	799±78
γ-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3

*, **: Values are significantly different from control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

TP, total protein; A/G, albumin/globulin ratio; Alb, albumin; T. Bil, total bilirubin; Glu, glucose; TG, triglyceride; T. Cho, total cholesterol; PL, phospholipid; BUN, blood urea nitrogen; CRN, creatinine; Ca, calcium; P, inorganic phosphorus; Na, sodium; K, potassium; Cl, chloride; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; γ-GT, γ-glutamyl aminotransferase.

Table 3. Histopathological findings in male F344 rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 4 weeks.

	Control	60 mg/kg/day	180 mg/kg/day	540 mg/kg/day
No. of animals	5	5	5	5
Liver				
Microgranuloma, minimal	0	0	1	0
Cyst	0	0	0	1
Kidney				
Hyaline droplet, proximal, minimal	5	5	5	0
Nasal cavity				
Necrosis, olfactory epithelium, slight	0	0	0	5

オルガノイドの調製、オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備

研究分担者 今井俊夫 国立がん研究センター・研究所・動物実験部門長

研究要旨

本分担研究課題においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的として、バリデーション試験において使用する陽性および陰性対照物質の選択と発がん感受性に対するオルガノイド樹立に使用するマウス系統差を明らかにするための解析を行っている。今年度は、陽性対照物質として遺伝毒性発がん物質であるメタンスルホン酸エチル（EMS）、アクリルアミド（AA）およびジエチルニトロソアミン（DEN）を用い、マウス系統としてCByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (rasH2) およびnon-Tgマウスを用いて、肺および肝臓（胆管）オルガノイドに対する化学物質による発がん作用を検討した。結果として、rasH2マウス由来肺オルガノイドと肝臓（胆管）オルガノイドのEMS高濃度処置群、rasH2マウス由来肺オルガノイドのAA高濃度処置群で発がん性を示す上皮細胞の重層化／浸潤性／異型性が1/4～2/4の頻度でみられたが有意差はなかった。non-Tgマウス由来オルガノイドでは、DEN高濃度処置した肝臓（胆管）オルガノイドで1/4で変化がみられたのみであった。以上より、rasH2マウス由来肺および肝臓（胆管）オルガノイドは遺伝毒性発がん物質の*in vitro* 処置に対して軽度の発がん感受性を示すものの、平成30年度に用いたC57BL (B6) 背景あるいはBALB/c背景の*Trp53* ヘテロノックアウトマウスあるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイドに比しその感受性が低いことが示された。

A. 研究目的

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究において、レポーター遺伝子導入マウスから3次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質を検出し、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウスあるいはshRNAにより発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系を用いることで既知の発がん物質による造腫瘍性あるいは上皮細胞の重層化・浸潤性・異型性の誘発を指標とする発がん性物質を検出する方法を確立する。本分担研究においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的としている。平成30年度は、*gpt delta*マウス、BALB/c背景*Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス、およびC57BL (B6) 背景LSL-*Kras*^{G12D}マウス（Cre導入あるいは陰性対照としてpLKO.1導入）の正常組織として肺と肝臓（胆管）からオルガノイドを調製して研究に供した。今年度は、マウス系統差を明らかにする一環として、CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (rasH2) およびnon-Tgマウス由来のオルガノイドを用いた解析を行った。

具体的には、平成27～29年度厚生労働科学研究費

補助金（食品の安全確保推進研究事業）「腫瘍性病変をエンドポイントとするオルガノイド系を用いる食品添加物等の遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発」においてオルガノイドに対する*in vitro* 処理により発がん性を示す形態学的変化を誘発することを明らかにしたメタンスルホン酸エチル（EMS）、アクリルアミド（AA）を陽性対照物質とし、更にジエチルニトロソアミン（DEN）を加え、陰性対照物質としては安息香酸ナトリウム（SB）を用いた。rasH2マウスとnon-Tgマウスの肺オルガノイドにはEMS、AA、SBを、同系統マウスの肝臓（胆管）オルガノイドにはEMS、DEN、SBを*in vitro*で処置した。各化学物質の発がん性評価は、オルガノイドをヌードマウス皮下に接種後8週間経過後に採取した組織の病理組織学的解析により行った。

rasH2マウスはヒトプロト型*Hras*遺伝子の3コピーがタンデムに挿入されたマウスであり（Tamaoki N. *Toxicol Pathol* 29(Suppl.)81-89, 2001）、遺伝毒性発がん物質のみならず非遺伝毒性発がん物質を26週間投与することでそれらの発がん性が検出可能であることが示されている。今年度の本研究課題においては、rasH2マウスの正常組織由来オルガノイドにお

いても、遺伝毒性発がん物質の*in vitro* 処置により発がん性が示されることを期待して行った。しかしながら、結果としてrasH2マウス由来肺および肝臓(胆管)オルガノイドは遺伝毒性発がん物質の*in vitro* 処置に対して軽度の発がん感受性を示すものの、平成30年度に用いたC57BL (B6) 背景あるいはBALB/c背景の*Trp53* ヘテロノックアウトあるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイドに比しその感受性が低いことが示された。この結果を受け、活性型*Kras*遺伝子を導入したLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイドを用いる*in vitro* 処置による発がん性の再現性検証とともに、オルガノイドにおける発がん感受性に差がみられる機序解析を開始した。

B. 研究方法

(1) マウス正常組織からのオルガノイドを樹立および樹立したオルガノイドに対する化学物質の*in vitro*暴露

1) オルガノイドの調製

CB6F1 背景である CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (rasH2) およびnon-Tgマウスの肺および肝臓からオルガノイドを調製した。調製手順の概略は次の通りである。

[1日目]

- i) 肺・肝臓を摘出、細切、酵素処理
- ii) 12ウェルプレートにマトリゲルを滴下、37°Cで固まらせた上に単離細胞を播種し液体培地にて1日間培養

[2日目]

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

[1週間目 (オルガノイドの増殖程度で判断)]

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

2) 凍結保存したオルガノイドの解凍・培養

平成30年度に調製したLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺オルガノイドについては、ラボバンカー2 (十慈フィールド) にて凍結後マイナス80°Cにて保存したものを解凍して用いた。

[解凍および培養]

- i) 37°Cの温浴槽にて速やかに融解後、D-PBS(-)にて2回洗浄
- ii) オルガノイドとマトリゲルを混和してプレート上に滴下し固まらせ、液体培地にて培養
- iii) 上記のrasH2マウス由来オルガノイドと同様に2

~3回継代して死細胞などを除去

3) オルガノイドへの化学物質暴露

i) 被験物質と適用オルガノイド:

メタンスルホン酸エチル (EMS) ;平成30年度においてB6およびBALB/c背景*Trp53* ヘテロノックアウト・野生型マウスあるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺および肝臓(胆管)オルガノイドに対して処置した際と同条件で比較するため、今年度のrasH2マウスおよびnon-Tgマウス由来の肺および肝臓(胆管)オルガノイドに対しても0、0.05、0.2 mM (+S9 mix 添加なし) 濃度にて暴露した。

ジエチルニトロサミン (DEN) ; rasH2マウスおよびnon-Tgマウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドに対して、0、0.2、1.0 mM (+S9 mix) 濃度にて暴露した。

アクリルアミド (AA) ; rasH2マウスおよびnon-Tgマウス由来の肺オルガノイドに対して、0、0.28、1.4 mM (+S9 mix) 濃度にて暴露した。

安息香酸ナトリウム (SB) ; rasH2マウスおよびnon-Tgマウス由来の肺オルガノイドに対して、0、5、20 mM (+S9 mix) 濃度にて暴露した。

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

iii) LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺オルガノイドに対してはEMS、AA、SBにて上記濃度にて処置した。

4) オルガノイドのヌードマウス皮下への接種

[オルガノイドの継代・培養を3回程度繰返し後]

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

(2) ヌードマウス皮下に接種したオルガノイドから形成された組織に対する病理組織学的評価

1) パラフィン包埋切片の作製と病理組織学的評価

接種8週後に熟練した技術者によりヌードマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、皮下から結節/腫瘍あるいはオルガノイド接種部位を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて1日固定した。常法に従い、パラフィン包埋した後、4 μmの切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験の実施にあたり「動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、平成

29年最終改正法律第51号)」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号、平成25年最終改正環境省告示第84号)」及び「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日厚生労働省通知、平成27年2月20日一部改正)」を遵守した。また、「国立研究開発法人国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出し、理事長の実施承認を得た。実際の実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、屠殺は頸椎脱臼やイソフルラン麻酔下にて腹部大動・静脈からの脱血により行うなど動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号、平成29年最終改正法律第41号)等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認を得た後に実施した。

C. 研究結果

(1) メタンスルホン酸エチル(EMS)

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下におけるrasH2およびnon-Tgマウス由来の肺オルガノイドについて、EMS処置群と非処置群ともに長径2.7~5.5 mm程度の白色~乳白色透明の結節としてみられ、EMS処置による明らかな違いは認められなかった(写真1-1)。肝臓(胆管)オルガノイドについても、EMS処置群と非処置群ともに長径4.2~9.2 mm程度の白色~乳白色透明の結節(一部赤褐色出血痕または透明嚢胞を含む)としてみられ、EMS処置による明らかな違いは認められなかった(写真1-2)。

2) 病理組織学的所見

rasH2マウス由来の肺オルガノイドのEMS高濃度処置群1/4例において、発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性がみられたものの(写真2-1)有意ではなかった。肝臓(胆管)オルガノイドについても、EMS高濃度処置群2/4例において重層化/浸潤性がみられたものの(写真2-2)有意ではなかった。

(表1)

(2) ジエチルニトロサミン(DEN)

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下におけるrasH2およびnon-Tgマウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドについて、DEN処置群と非処置群ともに長径4.6~8.9 mm程度の無色透明~白色~乳白色透明の結節(一部赤褐色出血痕または透明嚢胞を含む)としてみられた。rasH2マウス由来オルガノイドのDEN低濃度処置群1/4例において径8 mm程度の大型嚢胞がみられたが、

DEN処置による明らかな違いは認められなかった(写真1-3)。

2) 病理組織学的所見

rasH2マウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドのDEN低濃度処置群1/4例にみられた肉眼的に大型嚢胞として認められた部位において、上皮細胞の重層化と乳頭状増殖がみられ発がん性を示唆する所見と考えられたが(写真2-3)、DEN処置濃度に対応した変化ではなかった。non-Tgマウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドについては、DEN高濃度処置群1/4例において重層化/浸潤性がみられたものの有意ではなかった。(表1)

(3) アクリルアミド(AA)

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下におけるrasH2およびnon-Tgマウス由来の肺オルガノイドについて、AA処置群と非処置群ともに長径3.5~8.0 mm程度の白色~乳白色透明の結節(一部赤褐色出血痕を含む)としてみられ、AA処置による明らかな違いは認められなかった(写真1-4)。

2) 病理組織学的所見

rasH2マウス由来の肺オルガノイドのAA高濃度処置群2/4例において、発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性がみられたものの(写真2-4)有意ではなかった。(表1)

(4) 安息香酸ナトリウム(SB)

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下におけるrasH2およびnon-Tgマウス由来の肺オルガノイドについて、SB処置群と非処置群ともに長径3.7~8.6 mm程度の白色~乳白色透明の結節(一部赤褐色~黒色出血痕を含む)としてみられ、SB処置による明らかな違いは認められなかった。肝臓(胆管)オルガノイドについても、EMS処置群と非処置群ともに長径3.2~14.7 mm程度の白色~乳白色透明の結節(一部赤褐色出血痕または黒色液を容れる大型嚢胞を含む)としてみられ、EMS処置による明らかな違いは認められなかった

2) 病理組織学的所見

rasH2およびnon-Tgマウス由来の肺オルガノイドおよび肝臓(胆管)オルガノイドについて、SB処置による影響はみられなかった。

以上、rasH2マウス由来肺および肝臓(胆管)オルガノイドは遺伝毒性発がん物質の*in vitro* 処置に対して軽度の発がん感受性を示すものの、平成30年度に用いたC57BL(B6)背景あるいはBALB/c背景の*Trp53*ヘテロノックアウトマウスあるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイドに比しその感受性が低いことが示された。

平成30年度の本研究課題において、被験物質により発がん性を示す病理組織学的変化にマウス系統差がみられることが明らかとなったことを受け、今年度

はrasH2マウスの正常組織由来のオルガノイドを中心に検討を進め、上記の結果を得た。昨年度は更に技術的な課題として、SBの評価を行ったBALB/c背景野生型マウス由来の肺オルガノイド、BALB/c背景 *Trp53* ヘテロノックアウトマウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドなどでは化学物質非処置群において一定頻度で上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性がみられたことを挙げた。その詳細な原因は不明であったが、マウス組織から樹立したオルガノイドを一旦凍結保存、その後融解したものを使用することをその可能性の一つとして考えていた。今年度に使用したrasH2マウスおよびnon-Tgマウス由来の肺および肝臓(胆管)オルガノイドについては凍結を経ないもののみを使用し、昨年度のSB群の化学物質非処置オルガノイドで観察されたような上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性は観察されなかった。一方、LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイドについては今年度に凍結後解凍したものの再培養を開始しており、引続き観察を続けることとする。

本分担研究課題における活動の一部として、2019年9月にフィンランド、ヘルシンキで開催されたEuroTox2019で研究成果の一部をポスター発表した。同じフロアにて肝臓オルガノイドあるいは腸管オルガノイドを使用した毒性試験、毒性機序解析の発表があり、情報交換をすることができた。本研究課題における多施設での技術共有に関しては、日本国内における毒性学分野での三次元培養法の活用・発展に寄与するものと考えている。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Machida, Y., Sudo, Y., Uchiya, N., Imai, T.: Increased susceptibility to mammary carcinogenesis and an opposite trend in endometrium in *Trp53* heterozygous knockout female mice by back-crossing the BALB/c strain onto the background C3H strain. *J. Toxicol. Pathol.* 32, 197-203 (2019)
- (2) Matsuura, T., Maru, Y., Izumiya, M., Hoshi, D., Kato, S., Ochiai, M., Hori, M., Yamamoto, S., Tasuno, K., Imai, T., Aburatani, H., Nakajima, A., Hippo, Y.: Organoid-based ex vivo reconstitution of *Kras*-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis* doi: 10.1093/carcin/bgz122 (2019)
- (3) Moro, H., Hattori, N., Nakamura, Y., Kimura, K., Imai, T., Maeda, M., Yashiro, M., Ushijima, T. Epigenetic priming sensitizes gastric cancer cells to irinotecan and cisplatin by restoring multiple pathways. *Gastric Cancer* 23, 116-117 (2020)
- (4) Naruse, M., Masui, R., Ochiai, M., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T. An organoid-based carcinogenesis model induced by *in vitro*

chemical treatment. *Carcinogenesis* doi: 10.1093/carcin/bgaa011 (In press)

2. 学会発表

- (1) 今井俊夫, 増井亮一、中西もも、中西りり、町田雪乃、成瀬美衣: BALB/c 背景 p53(+/-)マウス乳腺オルガノイドに対する DMBA の発がん作用. 第 66 回日本実験動物学会総会(2019年5月、福岡)
- (2) Imai T., Masui R, Nakanishi R, Machida Y, Ochiai M, Naruse M: *In vitro* treatment of DMBA to murine mammary tissue-derived organoids induced adenocarcinomas/squamous cell carcinomas after their subcutaneous injection to nude mice. EuroTox 2019 (2019年9月、ヘルシンキ)
- (3) 今井俊夫, 町田雪乃、落合雅子、成瀬美衣: DMBA の *in vitro* 処置により誘発されたマウス乳がんの遺伝子変異解析. 第 78 回日本癌学会学術総会 (2019年9月、京都)

E. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

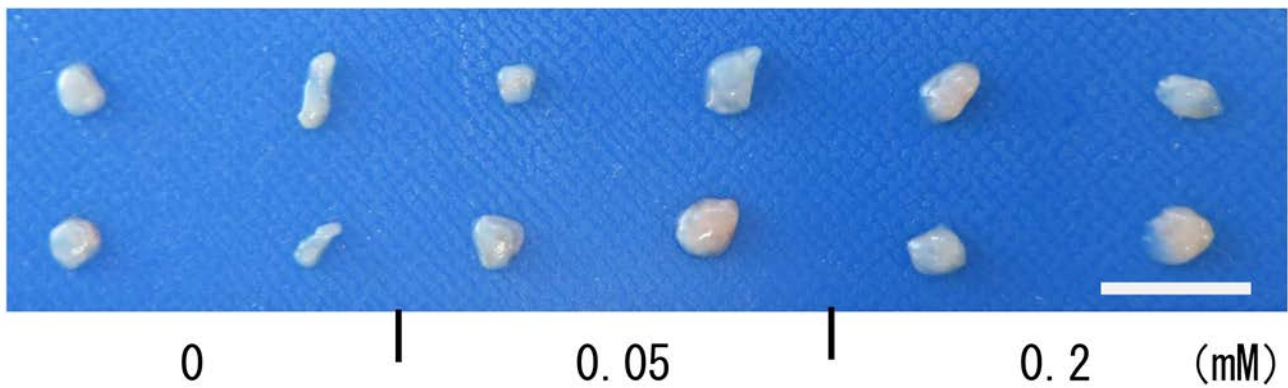
該当なし。

(表1)

マウス肺/肝由来オルガノイドに対する化学物質処置によるヌードマウス皮下での病理組織学的変化(上皮浸潤性/重層化)

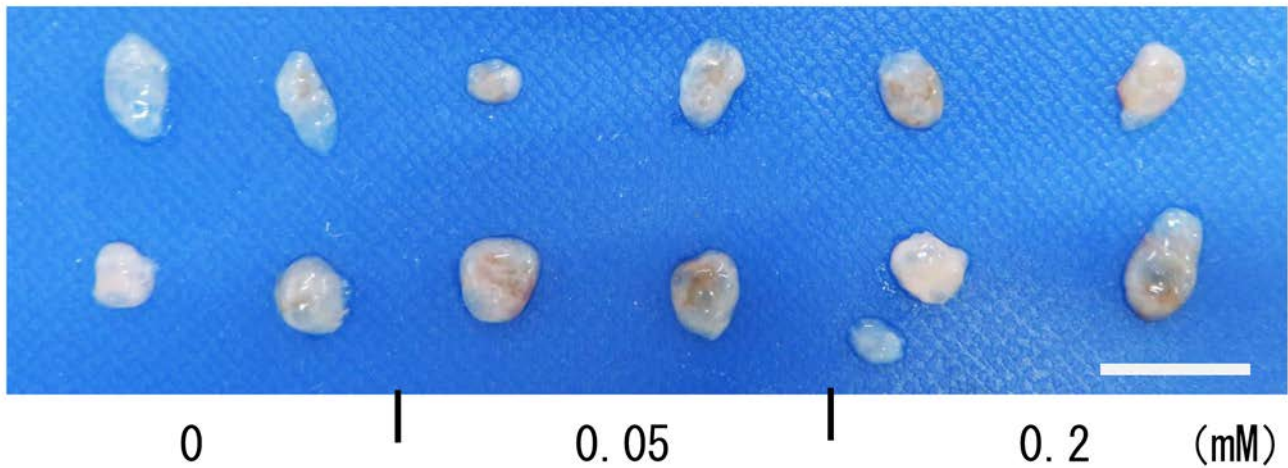
マウス系統	遺伝子型	臓器	被験物質											
			メタンサルホン酸エチル			ジエチルニトロサミン			アクリルアミド			安息香酸ナトリウム(陰性対照)		
			対照	低濃度	高濃度	対照	低濃度	高濃度	対照	低濃度	高濃度	対照	低濃度	高濃度
CB6F1	non-Tg	肺	0/4	0/4	0/4				0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	rasH2		0/4	0/4	1/4				0/4	0/4	2/4	0/4	0/4	0/4
CB6F1	non-Tg	肝	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4				0/4	0/4	0/4
	rasH2		0/4	0/4	2/4	0/4	1/4*	0/4				0/4	0/4	0/4

* 乳頭状増殖



rasH2マウス由来肺オルガノイドーEMS処置実験
Bar = 1 cm

(写真1-1) EMS処置したrasH2マウス由来の肺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の肉眼像。



rasH2マウス由来肝臓 (胆管) オルガノイドーEMS処置実験
Bar = 1 cm

(写真1-2) EMS処置したrasH2マウス由来の肝臓 (胆管) オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の肉眼像。



0 0.2 1.0 (mM)

rasH2マウス由来肝臓（胆管）オルガノイドーDEN処置実験
Bar = 1 cm

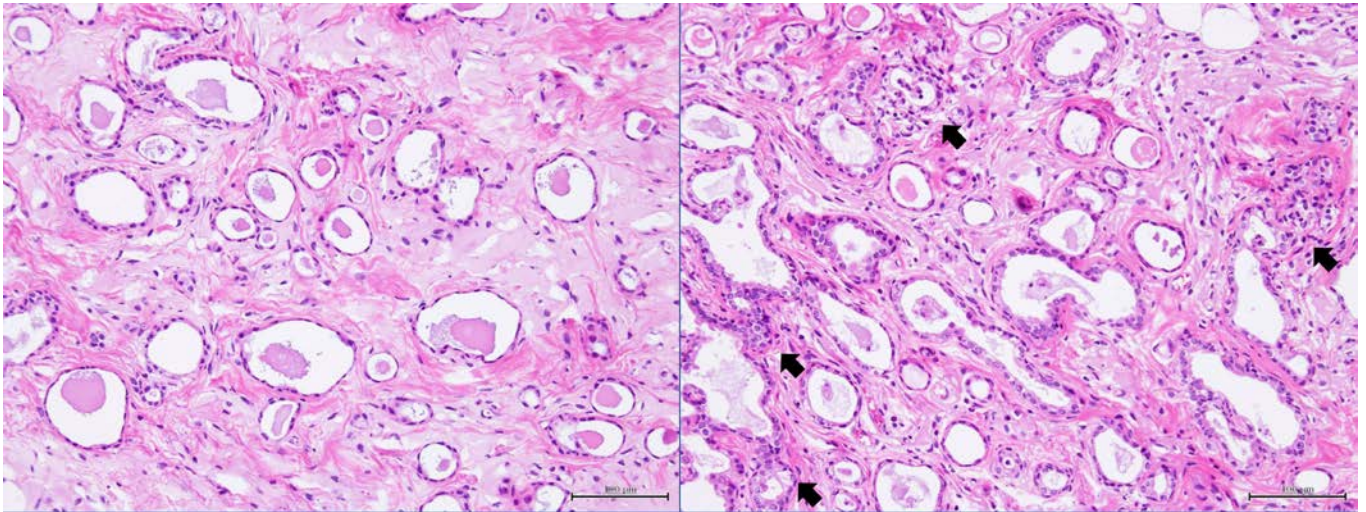
（写真1-3）DEN処置したrasH2マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の肉眼像。



0 0.28 1.4 (mM)

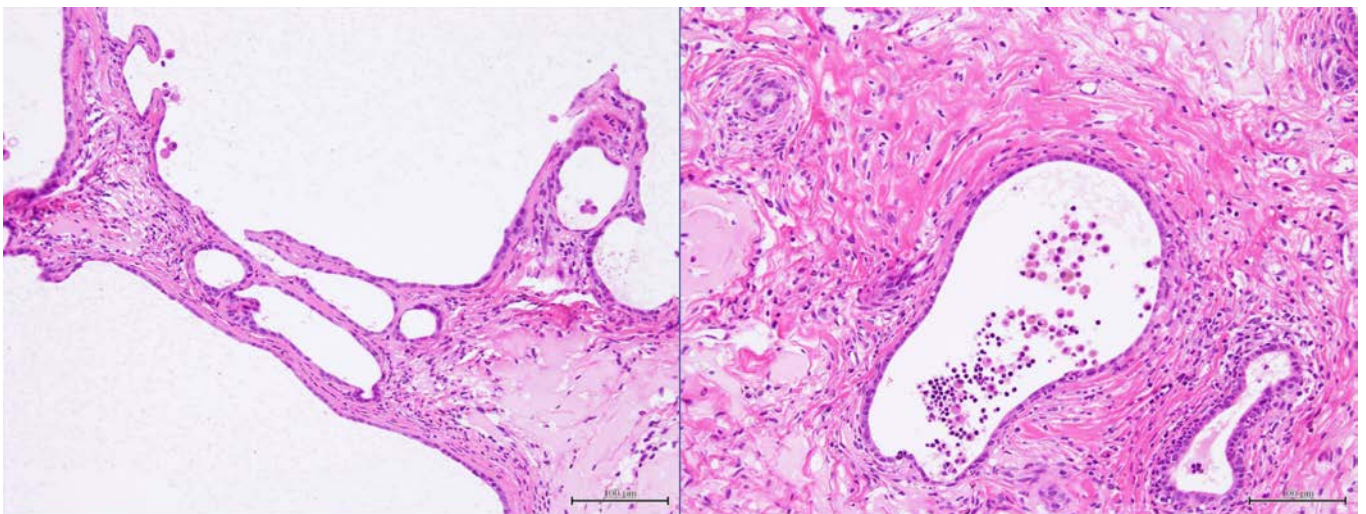
rasH2マウス由来肺オルガノイドーAA処置実験
Bar = 1 cm

（写真1-4）AA処置したrasH2マウス由来の肺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の肉眼像。



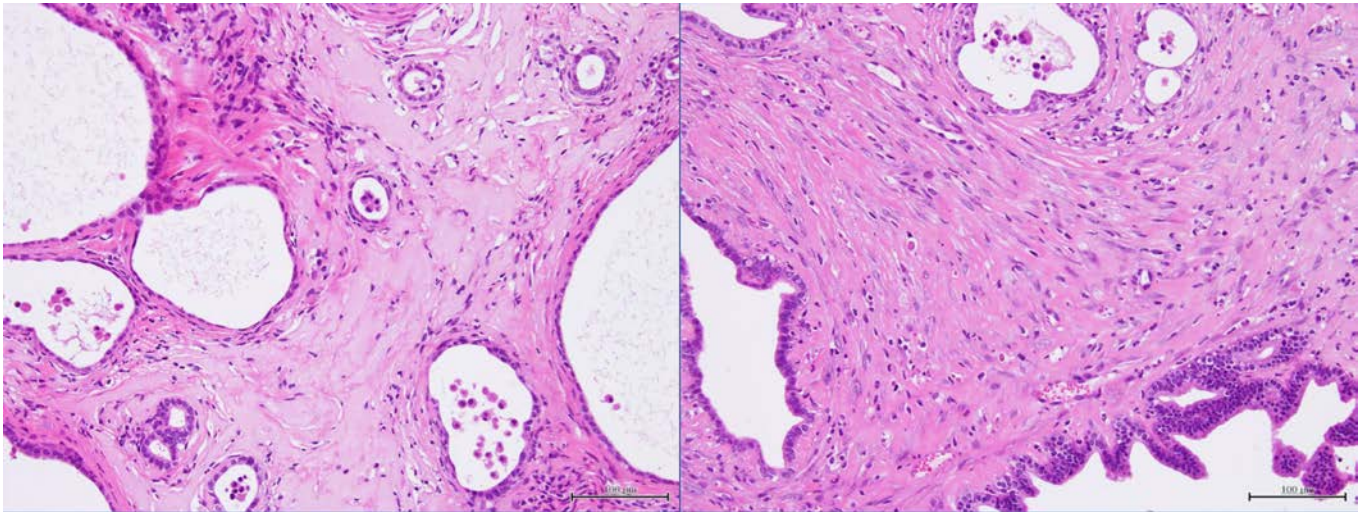
rasH2マウス由来肺オルガノイドーEMS処置実験
 (左、対照群 0 mM : 右、高濃度群 0.2 mM)
 Bar = 100 μ m

(写真2-1) EMS処置したrasH2マウス由来の肺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。対照群(左)では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。EMS高濃度群(右)では上皮細胞が一部多層化し、周囲組織に浸潤する像がみられる(矢印)。



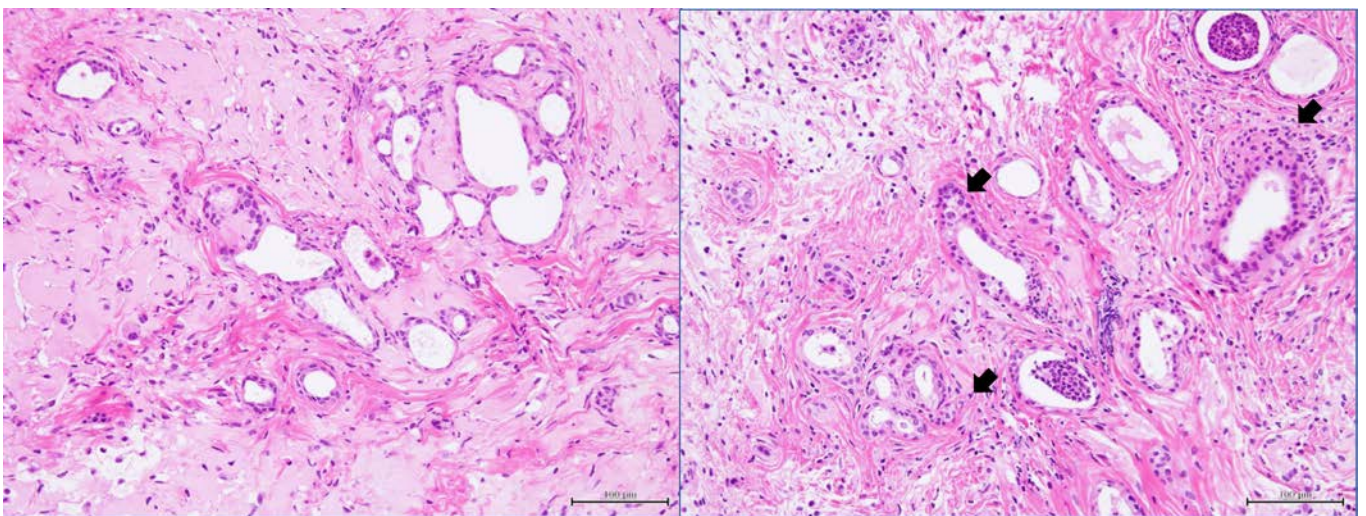
rasH2マウス由来肝臓(胆管)オルガノイドーEMS処置実験
 (左、対照群 0 mM : 右、高濃度群 0.2 mM)
 Bar = 100 μ m

(写真2-2) EMS処置したrasH2マウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。対照群(左)では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。EMS高濃度群(右)では上皮細胞が一部多層化し、周囲組織に浸潤し炎症細胞が反応している像がみられる。



rasH2マウス由来肝臓（胆管）オルガノイド-DEN処置実験
 （左、対照群 0 mM : 右、低濃度群 0.2 mM）
 Bar = 100 μm

（写真2-3）DEN処置したrasH2マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。対照群（左）では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。DEN低濃度群（右）では上皮細胞が一部多層化し、乳頭状に増殖している像がみられる。



rasH2マウス由来肺オルガノイド-AA処置実験
 （左、対照群 0 mM : 右、高濃度群 1.4 mM）
 Bar = 100 μm

（写真2-4）AA処置したrasH2マウス由来の肺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。対照群（左）では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。AA高濃度群（右）では上皮細胞が一部多層化し、周囲組織に浸潤する像がみられる（矢印）。

分担研究報告書

オルガノイドの調製

研究分担者 落合 雅子

国立研究開発法人国立がん研究センター研究所 研究員（非常勤）

研究要旨

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究において、レポーター遺伝子導入マウスから3次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質を検出し、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウスあるいはshRNAにより発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系を用いることで腫瘍様組織あるいは増殖活性・異型性・浸潤性を指標として既知の発がん性物質を検出する方法を確立する。本分担研究においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的としている。令和元年度は、*rasH2*マウス、*non-Tg*マウスについては肺および肝臓（胆管）オルガノイドを新たに調製し、*gpt delta*マウス、BALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス、およびB6背景LSL-*Kras*^{G12D}マウス（Cre導入あるいは陰性対照としてpLKO.1導入）の肺オルガノイドについては平成30年度に調製して凍結保存したものを解凍、2～3代培養・継代した。なお、分担研究者へ調整済みオルガノイドの送付する際、今年度は平成30年度に行った常温条件での輸送に加えて冷蔵条件での輸送も試みたが、一時的な冷蔵はオルガノイドにダメージを与えることが分かった。

A. 研究目的

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究において、レポーター遺伝子導入マウスから3次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質を検出し、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウスあるいはshRNAにより発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系を用いることで既知の発がん物質が腫瘍様組織あるいは増殖活性・異型性・浸潤性を指標とする発がん性物質を検出する方法を確立する。本分担研究においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的としている。今年度は、*rasH2*マウス、*non-Tg*マウスについては新たに肺および肝臓（胆管）オルガノイドの調製、および平成30年度に調製し凍結保存した*gpt delta*マウス、BALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス、およびB6背景LSL-*Kras*^{G12D}マウス（Cre導入あるいは陰性対照としてpLKO.1導入）マウス由来の肺オルガノイドを解凍・培養して分担研究者に供給した。

B. 研究方法

CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (*rasH2*) および*non-Tg*マウス（雄、4～5週齢）各2匹を日本クレア社より購入した。1週間の順化期間後に安楽死させ、肺と肝臓を摘出、以下の手順に従ってオルガノイドを調製した。

肺の肺門部、肝臓の肝門部を除いて細切し、PBS(-)中で強く攪拌した後に遠心した。DispaseII (Roche)、Collagenase P (Roche) を含む酵素液で37℃、30分間処置した後、ピペッティングにて細胞を分散させ、Cell strainerを通して、12ウェルプレートを用いてMatrigel (Corning) 上に播種し、BSAのほか、EGF (Peprotech)、Noggin (Peprotech)、Y27632 (和光純薬)、Jagged-1 (AnaSpec) など増殖因子を含む培地で37℃、5%CO₂下にて1日間培養、Matrigelを重層化して更に培養した。1週間に1回程度継代しつつオルガノイドを増やした。継代方法については「マウス正常組織由来オルガノイドの培養手順書」として平成30年度に纏めたSOPの記載に従って進めた。

平成30年度に調製し、保存液（ラボバンカー2-無血清タイプ、十慈フィールド）を用いて凍結保存した*gpt delta*マウス、BALB/c背景 *Trp53*ヘテロノック

アウトおよび野生型マウス、およびC57BL (B6) 背景LSL-*Kras*^{G12D}マウス (Cre導入あるいは陰性対照としてpLKO.1導入) マウス由来の肺オルガノイドを解凍した。解凍後は*rasH2*マウス、*non-Tg*マウス由来オルガノイドと同様に培養、2~3回継代して死細胞などを除去しつつ増やした。

増やしたオルガノイドについては、12ウェルプレートとして常温または冷蔵条件下にて宅配便で他の分担研究者へ送付した。

C. 研究結果と考察

*rasH2*および*non-Tg*マウス各2匹から肺および肝臓 (胆管) オルガノイドが調製できたが、各マウス由来のオルガノイドの増殖速度や形態には個体差がみられた。増殖が速やかでかつオルガノイドの形態が球形に近く均一なものについて以降の化学物質処置実験に供した。各化学物質処置は、8~15継代目のオルガノイドを用いて開始した。

解凍後に培養を継続した*gpt delta*マウス、BALB/c 背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス由来の肺オルガノイドについては、死細胞を除去しつつ細胞数を増やすため2~3回程度継代し培養した。

増やしたオルガノイドの他施設への輸送に際しては、12ウェルプレートで培養中の状態から培地のみを除き、重層したマトリゲル中で維持したまま宅配便により送付する方法を採用している。今年度は平成30年度に行った常温条件での輸送に加えて冷蔵条件での輸送も試みたが、到着時のオルガノイドの形態には大きな変化は認められなかったものの、培地を添加し37℃、5%CO₂下で培養してもオルガノイドは死滅することが分かった。季節を問わず施設間のオルガノイドの輸送を可能にするため、今後は庫内を37℃程度に維持できる輸送箱の準備を進める必要があると考えられた。

(倫理面への配慮)

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

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Matsuura, T., Maru, Y., Izumiya, M., Hoshi, D., Kato, S., Ochiai, M., Hori, M., Yamamoto, S., Tasuno, K., Imai, T., Aburatani, H., Nakajima, A., Hippo, Y.: Organoid-based ex vivo reconstitution of *Kras*-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis* doi: 10.1093/carcin/bgz122 (2019)
- (2) Ochiai, M., Yoshihara, Y., Maru, Y., Tetsuya, M., Izumiya, M., Imai, T., Hippo, Y.: *Kras*-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgz024 (2019)
- (3) Naruse, M., Masui, R., Ochiai, M., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T. An organoid-based carcinogenesis model induced by *in vitro* chemical treatment. *Carcinogenesis* doi: 10.1093/carcin/bgaa011 (In press)

2. 学会発表

- (1) Imai T, Masui R, Nakanishi R, Machida Y, Ochiai M, Naruse M: *In vitro* treatment of DMBA to murine mammary tissue-derived organoids induced adenocarcinomas/squamous cell carcinomas after their subcutaneous injection to nude mice. EuroTox 2019 (2019年9月、ヘルシンキ)
- (2) 今井俊夫、町田雪乃、落合雅子、成瀬美衣: DMBAの*in vitro*処置により誘発されたマウス乳がんの遺伝子変異解析. 第78回日本癌学会学術総会 (2019年9月、京都)

E. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

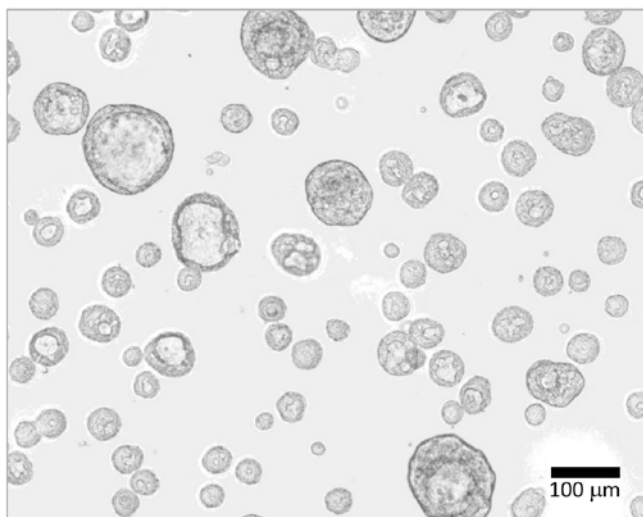
2. 実用新案登録

なし

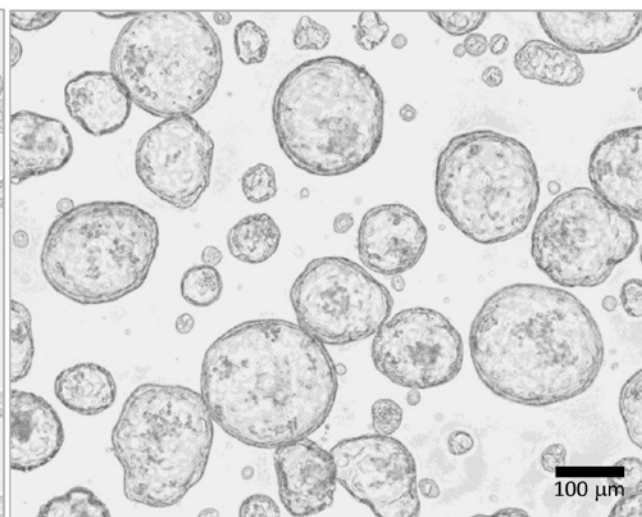
3. その他

なし

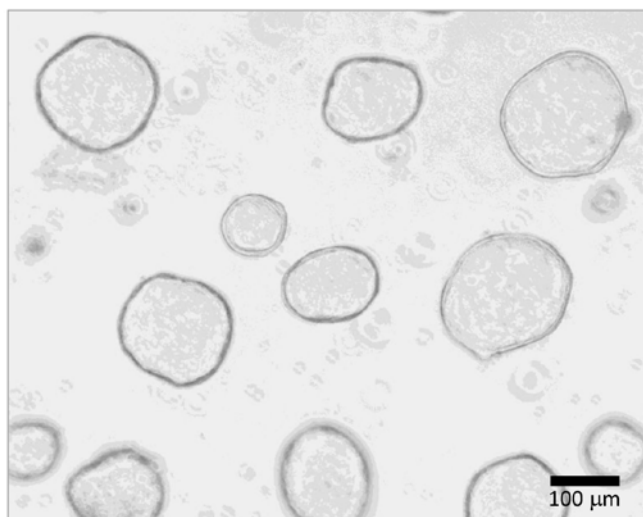
(写真) rasH2マウス、non-Tgマウス由来オルガノイド



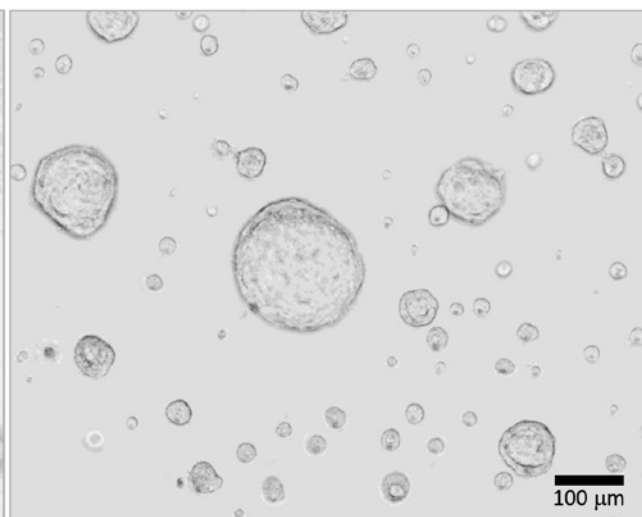
rasH2マウス由来肺オルガノイド
(EMS実験 - 対照 0 mM)



non-Tgマウス由来肺オルガノイド
(EMS実験 - 対照 0 mM)



rasH2マウス由来肝臓 (胆管) オルガノイド
(EMS実験 - 対照 0 mM)



non-Tgマウス由来肝臓 (胆管) オルガノイド
(SB実験 - 対照 0 mM)

オルガノイドを用いる遺伝毒性試験の技術整備

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

研究要旨

短・中期の発がん性が予測可能な簡便な*in vitro*試験法の確立を目的として、トランスジェニックマウスである*gpt delta*マウスより各種臓器のオルガノイドを作成し、食品添加物の遺伝毒性評価に応用可能かどうかについて検討を行っている。昨年度は、発がんの非標的臓器である肝臓由来の胆管系のオルガノイドを作成し、PhIPの遺伝毒性を解析したところ、変異頻度の上昇が観察された。PhIPの発がん標的臓器である大腸に比べると、胆管系オルガノイドでの変異頻度の上昇率が大きく、*in vivo*試験とは異なる様相を呈した。今年度は、同様に作成した肺オルガノイドに、加熱食品中に含まれるアクリルアミド(AA)を0, 0.28, 1.4 mMの濃度、S9mix存在下で曝露したところ、高用量曝露群において形態変化が観察されたことから、AAに曝露した肺オルガノイドのDNAを常法に則って回収し、*gpt*遺伝子を標的とした変異原性試験を行った。その結果、AAの濃度依存的に変異頻度が上昇する傾向が見られた。今後は、肺オルガノイドのAAに対する変異スペクトルを解析し、*in vivo*試験結果との比較を行うことにより、本試験系の妥当性の検討を行う予定である。

A. 研究目的

既存の食品添加物に対する*in vivo*遺伝毒性試験としては、小核試験（染色体異常試験）やレポーター遺伝子を標的とした遺伝子突然変異試験などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの試験のみでは食品添加物の発がん性の予測は難しい。通常、発がん性試験は大量の実験動物を用い、かつ長期間を要することから、短・中期の発がん性が予測可能な簡便な*in vitro*試験法が必要であると考える。本研究は、実験動物より作成した各臓器のオルガノイドを食品添加物の遺伝毒性及び発がん性の予測に用いることの妥当性について検討することを目的としている。昨年度までに遺伝毒性試験に汎用されているトランスジェニックマウスである*gpt delta*マウスより大腸、肝臓を摘出し、オルガノイドの安定した作成手法を確立し、それらオルガノイドを食品添加物の遺伝毒性試験に利用することの妥当性について検討してきた。今年度は、同様に作成した肺オルガノイドを用いて、加熱食品中に含まれるAAを曝露し、変異原性試験を行い、当試験の妥当性についてさらなる検討を行った。

B. 研究方法

① 肺オルガノイドへの被験物質の曝露

昨年度、*gpt delta*マウスより樹立した肺オルガノイドを用い、継代のタイミングでセルカウントし、12wellプレートへ 1.0×10^5 /wellに調製して播種した。そこへ、S9mixとAAを混合したものを加え、24時間曝露させた。曝露後、PBS(-)で1回洗浄し、マトリゲルを重層して液体培地を加え、約1週間培養した。

② *gpt*遺伝子を指標とした変異原性試験

コントロールおよびAAを曝露したからオルガノイドからDNAを抽出し、*in vitro*パッケージングによってトランスジーン λ EG10をファージ粒子として回収した。回収したファージをCre組替え酵素発現している大腸菌YG6020株に感染させると、 λ EG10上にある一組のloxP配列に挟まれた領域がCre組替え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後のYG6020菌液を6-thioguanin (6-TG) とchloramphenicol (Cm) を含むM9寒

天培地に播いて37°Cで培養すると、プラスミド上の*gpt*遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TGを含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cmを含むM9寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出した。

C. 研究結果

① 肺オルガノイドへの被験物質の曝露

継代毎に細胞数を揃えた肺オルガノイドへAAを曝露した結果、1.4 mMで形態変化が表れた。曝露直後ではいずれも形態変化を起こさなかったが、曝露後1週間の培養中に、0 mM、0.28 mMではオルガノイドのバルーン形状を保ったままであったが、1.4 mMではバルーン形状が崩れ、辺縁が波立った形態へと変化した(図1)。しかし、変異原性試験用に2回の継代をすると、1.4 mMで見られた形態変化したオルガノイドの数が減少した。

③ *gpt*遺伝子を指標とした変異原性試験

常法に則って肺オルガノイドからゲノムDNAを抽出し、インビトロパッケージング法により標的遺伝子をプラスミドとして回収し、*gpt*変異解析用の試験菌株に感染させて変異頻度の解析を行った。その結果、AA曝露によって変異頻度は0 mMと比べて0.28 mM (n=3)でおよそ2倍、1.4 mM (n=3)で約8倍と増加傾向が見られた(図2)。

(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、3Rの原則に則り、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

図1 肺オルガノイドの形態変化

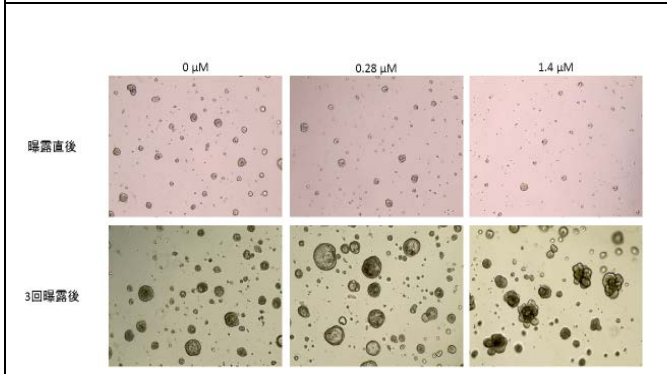
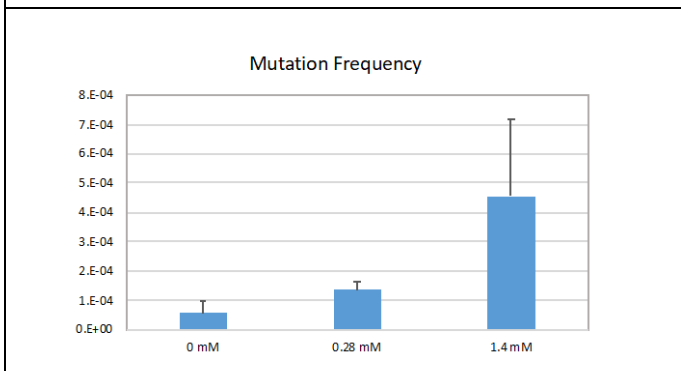


図2 肺オルガノイドを用いたAAの遺伝子変異原性試験



D. 研究発表

1. 論文発表

1. Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl- β -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review., *Mutation Res*, 2020, Feb - Mar;850-851:503148.
2. Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL. High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Res*. 2019 Nov;847:403022.
3. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Ishino K, Sato H, Kato M, Nagai M, Elzawahry A, Totoki Y, Nakamura H, Hosoda F, Shibata T, Matsuda T, Matsushima Y, Song G, Meng F, Li D, Liu J, Qiao Y, Wei W, Inoue M, Kikuchi S, Nakagama H, Shan B. DNA Adductome Analysis Identifies N-Nitrosopiperidine Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China. *Chem Res Toxicol*. 2019 Aug 19; 32 (8): 1515-1527.
4. Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 gpt delta transgenic rats. *Mutagenesis*. 2019

Sep 20; 34 (3): 279-287.

5. Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis*. 2019 Jun 20.
2. 学会発表
 1. Totsuka Y, Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
 2. Iwamura K, Shimada H, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Endo O, Totsuka Y, Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
 3. Ono H, Nagai M, Narushima D, Hamamoto R, Totsuka Y, Kato M. Detection of DNA adducts by nanopore sequencing using deep learning. 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
 4. Totsuka Y, Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 日本癌学会学術総会シンポジウム。(京都、2019年9月)
 5. Totsuka Y, Exploration of Esophageal Cancer Etiology using Comprehensive DNA Adduct Analysis (DNA Adductome Analysis) 2nd Hebei International Forum on Theory and Oractice of Cancer Prevention and Control (石家庄、2019年7月)
 6. Totsuka Y, How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting (リヨン、2019年7月)
 7. 戸塚ゆ加里 ナノマテリアルの遺伝毒性評価の動向 —JRC 会議に参加して— MMS 定例会 (京都、2019年6月)
 8. 戸塚ゆ加里 発がん性評価法としての DNA アダクトーム解析の展望 日本毒性学会シンポジウム (徳島、2019年6月)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

オルガノイドを用いる遺伝毒性試験の技術整備

研究分担者 三好規之 静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究要旨

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

A. 研究目的

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

パッケージング操作およびコロニー数のカウントを行った。

B. 研究方法

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

オルガノイドからのDNA抽出はRecoverEase DNA Isolation Kit（Agilent）を用いて行った。-80°Cで保存していたオルガノイドを lysis buffer 5 mLに懸濁した。Cell strainer を装着した50 mL tube に細胞懸濁液を移し、lysis buffer 3 mLで共洗ひした。遠心分離（4°C、4,500 rpm、20分）、上清を除去後、50 mL tube を逆さにして水分を除去した。さらに、付属の滅菌綿棒を用いて tube 内壁の水分を除いた。Digest solution（digestion buffer 98 μL、Rnase-It cocktail 2 μL/サンプル）を調製し、ペレットを剥がすように、digest solution 70 μLを添加した。50°Cのウォーターバスで45 min 反応させ、ペレットを溶解させた。反

応終了後、1×TE 300 μLを添加し、透析チューブにサンプルを移した。透析チューブに蓋をし、1×TE 500 mLに対し室温で72時間透析した。透析後、ワイドボアピペットチップを用いてDNA溶液を回収後、変異頻度の解析を行った。

*gpt*変異解析に使用した菌株は、国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部の杉山圭一先生に分与頂いた。

20% (w/v) maltose 50 μL, kanamycin (25 mg/mL) 5 μLを加えたLB培地 5 mLにYG6020を植菌した。37°Cで一晩振盪培養後、滅菌グリセロールを900 μL加え、ボルテックスした。調製したストックを超低温用のバイアルに移し、-80°Cで凍結した。

試験前日に、LB培地 2 mL、20% (w/v) maltose 20 μL, kanamycin (25 mg/mL) 2 μL, YG6020 (グリセロールストック)を加え、37°Cで一晩振盪培養した。また、6-TG (-) plate、6-TG (+) plateをそれぞれ作製した。Bacto agar 6 gをMQ-water 360 mLに添加し、オートクレーブした。そこに、10×M9 salt (Na₂HPO₄・7H₂O 128 g, KH₂PO₄ 30 g, NaCl 10 gをMQ-waterに溶解し、1 Lに調製) 40 mL、50% (w/v) glycerol 8 mL、1M MgSO₄ 800 μL、1M CaCl₂ 40 μL、1% (w/v) thiamine 200 μL、amino acids (10 mg/mLプロリン、ロイシン、イソロイシン) 1.6 mL、chloramphenicol (25 mg/mL) 400 μLを加え、プレートに25 mLずつ分注し、6-TG (-) plateを作製した。また、Bacto agar 10.5 gをMQ-water 630 mLに添加し、オートクレーブした。そこに、10×M9 salt 70 mL、50% (w/v) glycerol 14 mL、1M MgSO₄ 1.4 mL、1M CaCl₂ 70 μL、1% (w/v) thiamine 350 μL、amino acids 2.8 mL、chloramphenicol (25 mg/mL) 700 μL、6-thioguanine (25 mg/mL) 700 μLを加え、プレートに25 mLずつ分注し、6-TG (+) plateを作製した。

試験当日、LB培地 16.8 mL、20% (w/v) maltose 168 μL, kanamycin (25 mg/mL) 16.8 μL、前培養菌液420 μLを加え、振盪培養した。

*In vitro*パッケージングは Transpack Packaging Extract (Agilent) を用いて行った。Packaging kit の red tube に、抽出したDNA 10 μLを添加し、37°Cで90分反応させた。反応終了後、Blue tube のファージ12 μLを red tubeに添加、ピペッティングし、37°Cで90分反応させた。反応終了後、SM buffer (NaCl 0.29 g, MgSO₄・7H₂O 0.1 g, 1 M Tris-HCl 2.5 mL、2%ゼラチン溶液 0.25 mLをMQ-water 50 mLにメスアップ) 268 μLを添加、ボルテックスした。LB培地 198 μLに 1M MgSO₄ 1.98 μL、packaging 液 2 μLを加え、1/100 packaging 液を調製した。

振盪培養している菌液の濁度が OD₆₀₀=1.0 になり次第、50 mL tube に回収し、遠心 (4°C、4,000 rpm、

10分)、上清を除去後、LB培地 8.4 mL、20% (w/v) maltose 84 μL, kanamycin (25 mg/mL) 8.4 μLを加え、菌液を調製した。

1サンプルあたり7本の15 mL tube を用意し、菌液を200 μLずつ分注した。7本中2本を 6-TG(-) とし、1/100 packaging 液を10 μL添加した。残りの5本を6-TG(+) とし、packaging 液を60 μl 添加した。37°Cで20分静置後、37°Cで30分振盪した。

6-TG(-) としたサンプルに、6-TG(-) soft agar (Bacto agar 0.6 g, NaCl 0.6 g に MQ-water 100 mLを加えオートクレーブ) 2.5 mLを加え、ボルテックス後、6-TG (-) plate に重層した。6-TG(+) としたサンプルに、6-TG(+) soft agar (Bacto agar 0.6 g, NaCl 0.6 g, にMQ-water 100 mLを加えオートクレーブ後、25mg/mL 6-thioguanine 100 μL を添加) 2.5 mLを加え、ボルテックス後、6-TG (+) plate に重層した。Soft agar が固まったら、転置し37°Cで4日間培養した。

各 plate に出現したコロニーをカウントし、6-TG (+) plate に生えたコロニーを confirmation した。1/15 M Na-K buffer (Na₂HPO₄ 7.57 g, KH₂PO₄ 1.82 gをMQ-water に溶解し、pH 7.4に調製後1 Lにメスアップ) 50 μl を 96 well plate に分注した。滅菌爪楊枝で6-TG (+) plate に生えたコロニーを掻き取り、分注した1/15 M Na/K buffer で洗浄後、6-TG (+) plate、6-TG (-) plate の順にストリークした。ストリークした plate は 37°C で4日間培養し、コロニーの有無を確認した。

C. 研究結果

RecoverEase DNA Isolation Kitを用いて、アクリルアミドを曝露した*gpt delta*マウス肺オルガノイドのDNA抽出を行った。DNA濃度の測定結果は下記 (Table 1) のとおり。

Table 1 オルガノイドDNA抽出の結果

sample	A260	A260/A280	濃度(ng/ul)
control_1	0.21	1.64	103.5
control_2	0.30	1.65	150.0
control_3	0.13	1.67	62.5
0.28 mM アクリルアミド_1	0.20	1.76	99.5
0.28 mM アクリルアミド_2	0.24	1.69	119.0
0.28 mM アクリルアミド_3	0.19	1.79	96.5
1.4 mM アクリルアミド_1	0.31	1.73	157.0
1.4 mM アクリルアミド_2	0.29	1.70	147.0
1.4 mM アクリルアミド_3	0.17	1.76	83.5

次に、Transpack Packaging Extractを用いて*in vitro*パッケージングを行い、*gpt assay*を実施した。一回

目の試験の結果、6-TG(-) plate・6-TG(+) plate上に生育したコロニーが薄く、生育異常がみられた(図1左側)。そこで、グリセロールストックの再調製を行った。

20% (w/v) maltose 50 μ L、Kanamycin (25 mg/mL) 5 μ L を加えたLB培地 5 mLにYG6020を植菌し、37°Cで一晩振盪培養した。菌液を50 ml tube に回収し、遠心(4°C、4,000 rpm、10分)、上清を除去後、kanamycin含有プレートに塗布した。37°Cで一晩培養後、独立したコロニーを釣菌し、20% (w/v) maltose 50 μ L、kanamycin (25 mg/mL) 5 μ Lを加えたLB培地 5 mLに植菌した。37°Cで一晩振盪培養後、滅菌グリセロールを900 μ L加え、ボルテックスした。調製したストックを超低温用のバイアルに移し、-80°Cで凍結した。

新しく調製したグリセロールストックを用いて二回目のgpt assayを実施した結果、生育阻害は見られなかった(図1右側)。

現在までに三回の試験を終えたが、突然変異の検出に十分な数の変異コロニーは得られていない。今後も試験を継続し、突然変異の検出を試みる。

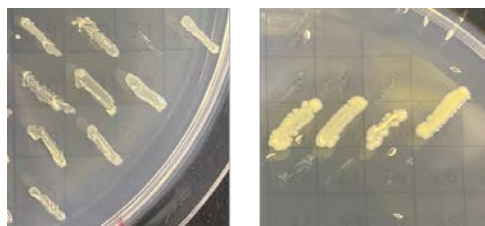


図1 Confirmation後のコロニー

(左：グリセロールストック再調製前、右：グリセロールストック再調製後)

D. 研究発表

1. 論文発表

Sanada S, Suzuki T, Nagata A, Hashidume T, Yoshikawa Y, Miyoshi N. Intestinal microbial metabolite stercobilin involvement in the chronic inflammation of *ob/ob* mice. *Sci. Rep.*, (2020) **10**, 6479.

Shimba Y, Katayama K, Miyoshi N, Ikeda M, Morita A, Miura S. β -aminoisobutyric acid suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Biol. Pharm. Bull.*, (2020) in press

Matsuzaki K, Iwai K, Yoshikawa Y, Shimamura Y, Miyoshi N, Hiramoto S, Asada K, Fukutomi R, Su H, Ohashi N. Wheat bran intake enhances to secrete bacteria-binding IgA into a lumen of the intestinal tract by the increment of short chain fatty acid production through the modulation of gut microbiota. *Nat. Prod. Commun.* (2020) in press

Uchikawa M, Kato M, Nagata A, Sanada S, Yoshikawa Y, Tsunematsu Y, Sato M, Suzuki T, Hashidume T, Watanabe K, Yoshikawa Y, Miyoshi N. Elevated levels of proinflammatory volatile metabolites in feces of high fat diet fed KK-A^y mice. *Sci. Rep.*, (2020) **10**, 5681.

Kawanishi M, Shimohara C, Oda Y, Hisatomi Y, Tsunematsu Y, Sato M, Hirayama Y, Miyoshi N, Iwashita Y, Yoshikawa Y, Sugimura H, Mutoh M, Ishikawa H, Wakabayashi K, Yagi T, Watanabe K. Genotyping of a gene cluster for production of colibactin and in vitro genotoxicity analysis of *Escherichia coli* strains obtained from the Japan Collection of Microorganisms. *Genes and Environment*, (2020) **42**, 11.

Sarmales-Murga C, Akaoka F, Sato M, Takanishi J, Mino T, Miyoshi N, Watanabe K. Novel class of dimeric product isolated from the fungus *Chaetomium globosum*: Evaluation of chemical structure and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*, (2020) **73**, 320-323.

Kondo T, Saigo S, Ugawa S, Kato M, Yoshikawa Y, Miyoshi N, Tanabe K. Prebiotic effect of fructooligosaccharides on the inner ear of DBA/2J mice with early-onset progressive hearing loss. *J Nutr Biochem.*, (2020) **75**, 108247.

Kawanishi M, Hisatomi Y, Oda Y, Shimohara C, Tsunematsu Y, Sato M, Hirayama Y, Miyoshi N, Iwashita Y, Yoshikawa Y, Sugimura H, Mutoh M, Ishikawa H, Wakabayashi K, Yagi T, Watanabe K. In vitro genotoxicity analyses of colibactin-producing *E. coli* isolated from a Japanese colorectal cancer patient. *J Toxicol Sci.*, (2019) **44**, 871-876.

Hirayama Y, Tsunematsu Y, Yoshikawa Y, Tamafune R, Matsuzaki N, Iwashita Y, Ohnishi I, Tanioka F, Sato M, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K. Activity-based probe for screening of high-colibactin producers from clinical samples. *Org Lett.*, (2019) **21**, 4490-4494.

Shimba Y, Togawa H, Senoo N, Ikeda M, Miyoshi N, Morita A, Miura S. Skeletal muscle-specific PGC-1 α overexpression suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Sci. Rep.*, (2019) **9**, 4077.

Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with *o*-toluidine and *o*-anisidine. *Arch. of Toxicol.*, (2019) **93**, 753-764.

2. 学会発表

加藤麻衣、橋詰力、庄司豊、庄司(加藤)久美子、五十嵐美樹、早川清雄、吉川悠子、三好規之：NASH - 肝発がんモデルマウス糞便中揮発性化合物の分析、第73回日本栄養・食糧学会大会(静岡)、2019年

5/17-19

加藤麻衣、橋詰力、庄司豊、庄司（加藤）久美子、五十嵐美樹、早川清雄、吉川悠子、三好規之：NASH - 肝発がんモデルマウスの糞便中揮発性化合物による発がんバイオマーカー探索、第26回日本がん予防学会（札幌）、2019年6/28-29

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、戸塚ゆかり、若林敬二、三好規之：メタボローム解析による膀胱発がん性芳香族アミン化合物の活性代謝物の解明、第26回日本がん予防学会（札幌）、2019年6/28-29

恒松雄太、吉川悠子、三好規之、武藤倫弘、山地太樹、張萌琳、岩崎基、松田尚久、細見晃司、國澤純、若林敬二、石川秀樹、渡辺賢二：大腸発がんリスク因子コリバクチンの生産性を制御する要因の解明、第26回日本がん予防学会（札幌）、2019年6/28-29

佐藤道大、平山裕一郎、恒松雄太、東口ふみ、吉川悠子、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、若林敬二、武藤倫弘、石川秀樹、渡辺賢二：遺伝毒性物質コリバクチン生産菌の高感度多検体検出法の確立、第26回日本がん予防学会（札幌）、2019年6/28-29

吉川悠子、平山裕一郎、松崎信生、東口ふみ、恒松雄太、佐藤道大、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、若林敬二、武藤倫弘、石川秀樹、渡辺賢二：大腸がん患者から分離した遺伝毒性物質コリバクチン合成遺伝子陽性大腸菌の解析、第26回日本がん予防学会（札幌）、2019年6/28-29

渡辺賢二、恒松雄太、平山裕一郎、東口ふみ、佐藤道大、吉川悠子、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、武藤倫弘、石川秀樹、若林敬二：大腸がんリスク因子コリバクチン産生菌の増殖抑制を目的としたパイロット介入試験、第26回日本がん予防学会（札幌）、

2019年6/28-29

Yuya Tajima, Takeshi Toyoda, Yuichiro Hirayama, Tsutomu Hashidume, Kohei Matsushita, Kumiko Ogawa, Kenji Watanabe, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, Noriyuki Miyoshi : Analysis of urinary bladder carcinogen o-toluidine metabolites forming DNA adduct, ACEM/JEMS2019 (Tokyo)、2019/11/18-20

Ai Ueshima, Yuuta Hisatomi, Yoshimitsu Oda, Yuta Tsunematsu, Michio Sato, Yuichiro Hirayama, Noriyuki Miyoshi, Yuji Iwashita, Yuko Yoshikawa, Haruhiko Sugimura, Takashi Yagi, Keiji Wakabayashi, Kenji Watanabe, Masanobu Kawanishi : Genotoxicity of colibactin-producing E. coli isolated from Japanese colorectal cancer patient, ACEM/JEMS2019 (Tokyo)、2019/11/18-20

Mai Kato, Tsutomu Hashidume, Yutaka Shoji, Kumiko Shoji, Miki Igarashi, Sumio Hayakawa, Yuko Yoshikawa, Noriyuki Miyoshi : Analysis of fecal gaseous metabolites in NASH-hepatocellular carcinoma model mice、ICoFF2019 (Kobe)、2019/12/1-5

E. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備、動物モデルにおける腫瘍性病変発臓器
における発がん性評価

研究分担者 筆宝義隆 千葉県がんセンター・研究所・発がん制御研究部長

研究要旨

遺伝子変異の蓄積はがんの大きな特徴であり、近年のがんゲノム解析の進展に伴い多数の異常が報告されている。しかし、そのうち遺伝子改変マウスの作製などにより個体レベルで実際のがんの原因であることが確認されたものはごく一部にとどまり、検証の迅速化が求められている。近年、3次元オルガノイド培養法の発達により様々な組織の正常細胞の培養が可能になったことを受けて、我々は様々な臓器由来のマウス正常細胞に対してレンチウイルスにより極めて高い効率で複数の遺伝子異常を再現する手法を確立し、ヌードマウス皮下において短期間で発がんを誘導する実験系の確立を進めている。発がん過程を細胞レベルで迅速に再現するため、発がん機構の詳細な解析を可能にするのみならず、個々の変異の発がん性への寄与度の検証や作製したがん細胞を用いた治療法の評価を容易にするなど、がん研究の様々な分野における高い有用性が期待されている。胃がんに関しては、がんで変異頻度が高い遺伝子の改変マウスによる発がんモデルは実は数が少なく、また胃は化学発がんにも比較的抵抗性であることが知られている。そこで、昨年度までに胃がんで変異頻度の高い TP53、CDH1、KRAS に着目し、マウス正常胃オルガノイドに単独または複数の遺伝子異常を再現することで、ヌードマウス皮下において腫瘍を作成した。今年度はさらに PIK3CA、APC についても、単独変異または TP53 変異と組み合わせる腫瘍を作成した。得られた腫瘍はいずれも腺癌の組織像を呈したが、このような結果は様々な変異を伴う胃がんモデルの作製が実現可能なことを示唆しており、化学発がんモデルの作成にも道を開くものと考えられる。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

(1) マウス胃オルガノイドの培養

マウスにおいては胃の口側半分は扁平上皮であり、ヒトの胃に相当するのは肛門側の腺胃にあたる。十分なマージンをもって腺胃を単離し、物理的な剪断と酵素処理によって上皮腺管を単離し、固化したマトリゲル上に散布する。メディアウムは腸管同様、Advanced DMEM/F12 に EGF, R-spondin1, Noggin, Y27632 (ROCK阻害剤)、CHIR99021 (GSK3阻害剤) を添加したものをを用いた。マウスとしては p53 のコンディショナルアレルのホモマウス (以下 Trp53^{f/f} と表記する)、Rosa26-Pik3ca コンディショナル変異アレルのノックインヘテロマウス (R26-Pik3ca^{H1047R})、Apc のコンディショナル truncation ホモ変異マウス (Apc^{580sf/f}) をを用いた。

(2) レンチウイルス感染

ベクターとしては pLKO.1 の骨格に Cre または shRNA を組み込んだものを使用した。HEK293FT 細胞を用いてウイルスを作成し、濃縮・凍結を行い使用時に解

凍した。オルガノイドの感染は完全に単一細胞にまで分散させた上で、マトリゲル上に一晚共培養することで行った。当該遺伝子の組み替えはゲノムPCRで確認し、標的遺伝子のノックダウンはpuromycinによる薬剤選択後にWestern blottingで確認した。

(3) 造腫瘍性の検証

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

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験の実施にあたり「動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、平成29年最終改正法律第51号)」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号、平成25年最終改正環境省告示第84号)」及び「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日厚生労働省通知、平成27年2月20日一部改正)」を遵守した。また、千葉県がんセンター動物実験委員会の承認を得て実験を行った。実際の実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、屠殺は頸椎脱臼やイソフルラン麻酔下にて腹部大動・静脈からの脱血により行うなど動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号、平成29年最終改正法律第41号)等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認を得た後に実施した。

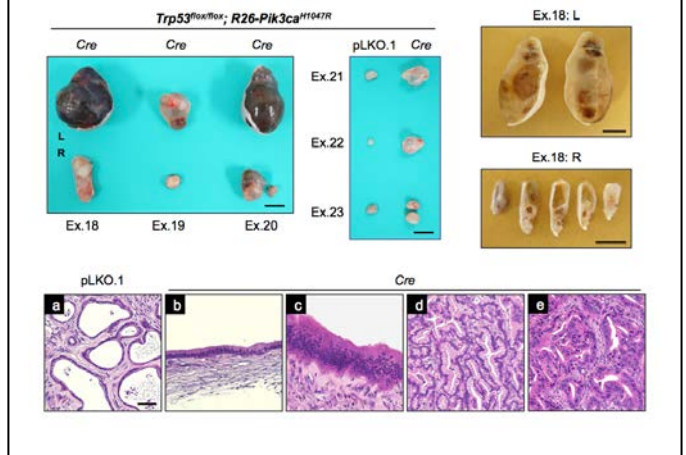
C. 研究結果

(1) Pik3ca活性化変異/p53欠失(図1)

PI3K経路の活性化は胃癌では高頻度で見られることから、p53欠失との発がん協調作用をオルガノイドを用いて検討した。他の遺伝子変異での検討と同様に、陰性対照においても皮下腫瘍を形成し、その組織像は異形を伴わなかった。一方で、Pik3ca変異を誘導したオルガノイドでは腫瘍の大きさは明らかに増大し、その性状は嚢胞主体だが一部固形腫瘍となる皮下腫瘍が形成された。また、一部の腫瘍の中には血性の液体貯留を認めた。実験により、組織像は良性に近いものから悪性まで多彩な像を示すことが特徴だった。腫瘍由来のオルガノイドについてpAKTのレベルをWestern Blotで評価したところ、予想されるように活性化の程度に差が認められ

たことから、Pik3caによるAKT活性化は遺伝学的な要素以外の制御も受けていることが示唆された。

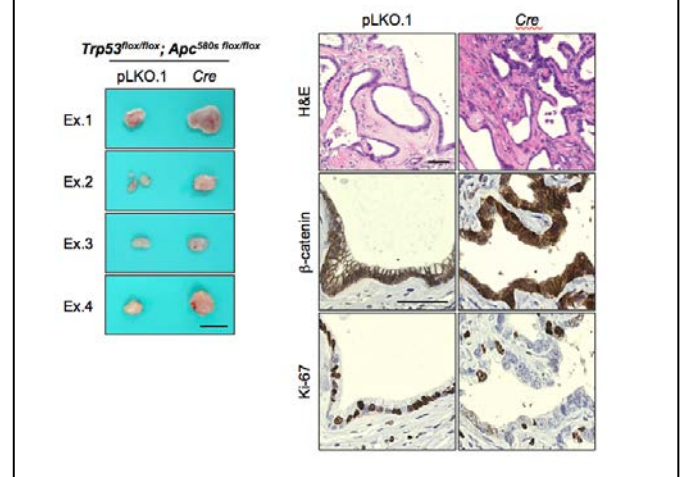
図1 p53KOとPik3ca活性化変異によるオルガノイドからの発がん誘導



(2) Apc欠失/p53欠失(図2)

胃癌における変異頻度ではp53が約半数で首位だが、Apc変異やCTNNB1変異によるWnt経路の活性化も高頻度で見られる。そこで、p53欠失とWnt経路の活性化の発がん協調作用をオルガノイドを用いて検討した。まず、皮下腫瘍の大きさはわずかに増大した程度に留まり、組織像についても軽度の異形にとどまっていると考えられた。ただし、Wnt経路の活性化の指標であるβカテニンの細胞膜から細胞質内及び核内への移行・蓄積自体は観察されたことからWnt経路の活性化とp53欠失の発がん協調作用は、あるとしても強いものとは考えにくかった。代表的な胃癌マウスモデルであるGANマウスにおいても、発がんにはWnt経路の活性化と炎症の協調作用が必要であることから、ex vivoの発がんモデルである本実験系においては炎症シグナルの取り込みは大きくないものと推定された。

図2 p53KOとApc欠失によるオルガノイドからの発がん誘導



D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Naruse M, Masui R, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, Imai T. An organoid-based carcinogenesis model induced by in vitro chemical treatment. *Carcinogenesis*. in press doi: 10.1093/carcin/bgaa011
- (2) Matsuura T, Maru Y, Izumiya M, Hoshi D, Kato S, Ochiai M, Hori M, Yamamoto S, Tatsuno K, Imai T, Aburatani H, Nakajima A, Hippo Y. Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis*. in press doi: 10.1093/carcin/bgz122
- (3) Maru Y, Kawata A, Taguchi A, Ishii Y, Baba S, Mori M, Nagamatsu T, Oda K, Kukimoto I, Osuga Y, Fujii T, Hippo Y. Establishment and molecular phenotyping of organoids from the squamocolumnar junction region of the uterine cervix. *Cancers*. 12(3), 694. doi.org/10.3390/cancers12030694. 2020
- (4) Maru Y, Tanaka N, Ebisawa K, Odaka A, Sugiyama T, Itami M, Hippo Y. Establishment and characterization of patient-derived organoids from a young patient with cervical clear cell carcinoma. *Cancer Sci*. 110 (9); 2992-3005. 2019
- (5) Maru Y, Hippo Y. Current status of patient-derived ovarian cancer models. *Cells*. 8(5). pii: E505. doi: 10.3390/cells8050505. 2019 [Review] 同誌の Editor's Choice に選出
- (6) Maru Y, Tanaka N, Itami M, Hippo Y. Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors. *Gynecol. Oncology*. 154(1): 189-198, 2019 doi: 10.1016/j.ygyno.2019.05.005
- (7) Ochiai M, Yoshihara Y, Maru Y, Matsuura T, Izumiya M, Imai T, Hippo Y. Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis*. 40:1142-1152. 2019
- (8) Maru Y, Onuma K, Ochiai M, Imai T, Hippo Y. Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoid. *Cancer Sci*. 110: 858-866, 2019 [Review] 同誌の Highlight に選出

2. 学会発表

- (1) 丸喜明、筆宝義隆 (口演) : 患者由来婦人科がん検体からのオルガノイド培養. 第 37 回日本ヒト細胞学会学術集会 2019 年 10 月 (東京)

- (2) 丸喜明、筆宝義隆 (シンポジウム) : オルガノイドを用いた婦人科がんの統合的研究. 第 78 回日本癌学会学術総会 (京都) 2019 年 9 月
- (3) 吉原靖典、丸喜明、筆宝義隆 (英語口演) : マウスオルガノイドを用いた胃発がんモデルの確立. 第 78 回日本癌学会学術総会 (京都) 2019 年 9 月
- (4) 丸喜明、筆宝義隆 (示説) : 患者由来卵巣がんからのオルガノイド培養. 第 61 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 (新潟) 2019 年 7 月
- (5) 丸喜明、筆宝義隆 (示説) : 正常子宮内臓オルガノイドへの遺伝子導入による高転移性がん細胞の直接誘導. 第 28 回日本がん転移学会学術集会・総会 (鹿児島) 2019 年 7 月
- (6) 丸喜明、筆宝義隆 (示説) オルガノイド培養を用いた婦人科腫瘍の統合的研究 第 108 回日本病理学会総会 (東京) 2019 年 5 月
- (7) 筆宝義隆 (シンポジウム) : マウスオルガノイドを用いた臓器横断的 ex vivo 発がんモデルの確立. 第 32 回モロシヌス研究会 (千葉) 2019 年 7 月
- (8) 丸喜明 (シンポジウム) : マウスおよび患者由来オルガノイドを用いた婦人科がんの統合的研究. 第 7 回細胞凝集研究会 (那覇) 2019 年 11 月
- (9) 丸喜明、筆宝義隆 (口演) : Establishment of Cell-based Carcinogenesis Models with Genetic Reconstitution of Murine Gastric Organoids. 第 34 回発癌病理研究会 (鳥羽) 2019 年 8 月
- (10) 丸喜明、筆宝義隆 (口演) : オルガノイドを用いた婦人科がんの統合的研究. 第 1 回日本癌学会若手の会 (熱海) 2020 年 2 月

E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備

研究分担者 平田暁大 岐阜大学・研究推進・社会連携機構・助教

研究要旨

本分担研究課題の目的は、マウス正常組織由来オルガノイドを用いるin vitro発がん性短中期試験を多施設で実施可能な方法として確立することである。本年度は、①施設間でのオルガノイドの最適な輸送方法を確立するため、輸送時の温度変化がオルガノイドに及ぼす影響を検討するとともに、②肺由来オルガノイドにアクリルアミドを処置し、処置後の形態変化およびヌードマウスにおける造腫瘍性を解析した。①については、冷蔵状態でのオルガノイドの輸送を試みたが、輸送後の培養時に立体構造が崩壊することが明らかになった。また、実験的にCO₂非制御下（CO₂インキュベーターの庫外）に18時間放置した場合、低温でインキュベートするとオルガノイドの崩壊が観察された。一方、37°Cに近い温度で維持すれば、オルガノイドの立体構造に大きな影響は見られなかった。②については、野生型マウスの肺由来オルガノイドにアクリルアミド（0、0.28、1.4mM）を3回処置し、病理組織学的にオルガノイドの形態変化を解析したところ、アクリルアミド処置後、オルガノイドの壁の重層化が観察された。高濃度処置後のオルガノイドにおいては、重度の重層化が認められ、内腔内に突出して増殖している像も観察された。一方、アクリルアミド処置後のオルガノイドをヌードマウスの皮下に接種し、8週間観察したところ、明瞭な腫瘍の形成は見られなかった。以上より、①オルガノイドは、培養条件に近い温度で輸送することが望ましく、また、②化学物質投与後の形態変化の観察が発がん性の評価に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

食品添加物等の生体における遺伝毒性評価法として、レポーター遺伝子をマウス・ラットに導入した遺伝子突然変異検出系の開発により評価精度が向上したが、発がん性については長期試験の時間・使用動物削減・経費面の課題と短・中期試験からの予測による不確実性を克服する評価法の開発を要する。我々はマウスの大腸・肺等の正常組織から3次元培養法によりオルガノイドを調製し、臓器毎の発がん機序に基づく遺伝子改変操作を加えてヌードマウスに皮下移植すると腫瘍様組織を形成し、既知の発がん物質処置により当該組織の増殖活性・異型性・浸潤性を指標とする悪性化が誘導できることを見出した。本研究では、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウス、レポーター遺伝子導入マウス等から調製したオルガノイド系あるいはそれらにshRNAを用いて発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系につき、遺伝毒性試験法としての適用性と腫瘍性病変をエンドポイントとする発がん性試験法としての妥当性を検証し、遺伝毒性・発がん性短期包括的試験法の開発を目指す。また、最終的に妥当性が検証されるとともに、多施設で実施可能な方法として確立できることが重要である。現在マウス正常組織から3次元培養法によりオルガノイドを調製する技術は幅広く行われてはならず、必要な試薬類にも高価なものが含まれる。しかし、経費面では長期発がん性試

験に対比し十分な費用対効果が見込まれ、普及面では哺乳類培養細胞を用いる小核試験等のように、実施機関や技術者の基盤整備・技術訓練により普及した系も存在することから、本研究での成果は広く食品添加物等の安全性評価に活用可能と考えられる。一方、オルガノイドの調製条件の違いにより施設間で得られる試験結果のばらつきが生じないように対策が必要である。

昨年度、本分担研究課題において、基幹施設（国立がん研究センター）で調整されたオルガノイドを研究分担者の所属施設（岐阜大学）に常温で輸送し、培養・継代できることを明らかにした。一方で、国内の気温の変動を考えると、季節を問わない安定した輸送方法が求められる。そこで、今年度は、安定したオルガノイドの輸送方法を確立することを目的として、実際に冷蔵での輸送を行うとともに、輸送中の温度変化がオルガノイドに及ぼす影響について実験的に検討した。

さらに、今年度は、輸送したオルガノイドを用いて化学物質の評価を行なった際に分与元の施設と同じ評価結果が得られるかを検討するために、マウスに肺発がん性を示すアクリルアミドでオルガノイドを処置し、ヌードマウスに皮下移植した際の造腫瘍性を評価した。また、アクリルアミド処置後のオルガノイドの形態変化を病理組織学的に解析した。

B. 研究方法

① 輸送時の温度条件がオルガノイドに及ぼす影響の検討

①-1. 冷蔵輸送がオルガノイドに及ぼす影響の解析
国立がん研究センターにて調製されたマウス肺由来オルガノイドを継代2日後に岐阜大学に輸送した。オルガノイドはマトリゲル内に包埋され、液体培地を抜いた状態で、冷蔵または常温にて輸送した。輸送に要した時間はおよそ18時間であった。到着後、マトリゲル上に液体培地を添加し、その後の成長および継代の可否について検討した。

①-2. 温度変化がオルガノイドに及ぼす影響の解析
マウス肺由来オルガノイドを継代後3あるいは9日目にCO₂濃度非制御下(外気)で4℃あるいは36℃で液体培地を抜いた状態で18時間放置し、その後、通常条件(37℃、CO₂濃度5.0%)で培養を行ない、継代後11日目で観察した。継代後9日目のオルガノイドはコンフルエントの状態であった。4℃の維持は冷蔵庫内で行い、36℃の維持は細胞株の輸送に用いられるiP-Tec潜熱蓄熱材-36(株式会社サンブラテック)を用いて行なった。通常条件(37℃、CO₂濃度5.0%)で培養を続けたオルガノイドを対照とした。

②アクリルアミド処置後の肺オルガノイドの解析
野生型マウスの肺由来オルガノイドにアクリルアミド(0, 0.28, 1.4mM)を3回処置し、オルガノイドを増殖させた後、オルガノイドの病理組織学的解析およびヌードマウスにおける造腫瘍性の検討を行なった。

②-1. 病理組織学的解析
iPGell(ジェノスタッフ社)を用いてオルガノイドを集め、定法に従い、パラフィン包埋切片を作製し、H&E染色を施し観察した。

②-1. ヌードマウスにおける造腫瘍性の検討
ヌードマウスの腹側部皮下に、マトリゲルと混和したオルガノイドを接種した。接種後、8週間飼育した。さらに、接種部位の組織を病理組織学的に解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、本学の動物実験委員会の承認を得た後に実施し、飼育、実験に際し、実験動物に対する動物愛護について十分に配慮した。

C. 研究結果

① 輸送時の温度条件がオルガノイドに及ぼす影響の検討

①-1. 輸送時の温度条件がオルガノイドに及ぼす影響の検討(図1)

常温で輸送されたオルガノイドはrasH2、non-Tgともに正常に成長し、到着5日目に継代が可能であった。

一方冷蔵で輸送されたオルガノイドはrasH2、non-Tgともに到着時に形態的な変化は観察されなかったが、到着2日後にはほぼすべてのオルガノイドが崩壊してシート状を呈し、継代は不可能であった。したがって、冷蔵輸送はオルガノイドの輸送には適さないことが明らかとなった。

①-2. 温度変化がオルガノイドに及ぼす影響の解析(図2)

継代後3あるいは9日目に4℃条件下に置いた場合、崩壊したオルガノイド観察された。一方、36℃条件下に置いた場合、オルガノイドは立体構造をよく保っていた。したがって、今回用いた保温器具等を用いて、通常培養時との温度変化を少なくして輸送することが有効と考えられた。

②アクリルアミド処置後の肺オルガノイドの解析

②-1. 病理組織学的解析(図3)

アクリルアミド処置後、オルガノイドの壁の重層化が観察された。濃度依存的に形態変化を示すオルガノイドの頻度が増加し、かつ形態変化も重度となった。高濃度処置後のオルガノイドにおいては、高度な重層化に加え、内腔内に突出する像も観察された。以上より、化学物質投与後のオルガノイドの形態変化の観察が発がん性の評価に有用である可能性が示唆された。今後、他の発がん性物質でも同様の変化が誘導されるか検討していく必要がある。

②-1. ヌードマウスにおける造腫瘍性の検討(図4・図5)

皮下接種8週間後には、肉眼的に明らかな腫瘍形成は認められなかった。組織学的解析では、接種部位においてオルガノイドが観察された(図5)。また、この結果は、オルガノイドの提供元である国立がん研究センターで行われた結果と一致していた。したがって、輸送したオルガノイドを用いて、分与先でも同じ試験結果が得られることが示された。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) [Hirata A](#), Hatano Y, Niwa M, Hara A, and Tomita H. Heterogeneity in Colorectal Cancer Stem Cells. *Cancer Prev. Res.* 12(7), 413-420, 2019. Review
- (2) [Hirata A*](#), Miyamoto Y, Kaneko A, Sakai H, Yoshizaki K, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, and Suzuki J. Hepatic Neuroendocrine Carcinoma in a Japanese Macaques (*Macaca fuscata*). *J. Med. Primatol.*, 48(2), 137-40, 2019.
- (3) [Hirata A*](#), Kaneko A, Sakai H, Nakamura S, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, Suzuki J. T-cell/Histiocyte-rich Large B-cell Lymphoma of the Larynx in a Juvenile Japanese Macaque (*Macaca fuscata*). *J. Comp. Pathol.* 169, 1-4, 2019
- (4) Kanayama T, Tomita H, Binh NH, Hatano Y, Aoki H,

- Okada H, Hirata A, Fujihara Y, Kunisada T, and Hara A. Characterization of a BAC transgenic mouse expressing *Krt19* -driven iCre recombinase in its digestive organs. *PLoS One* 14(8):e0220818. 2019
- (5) Goto M, Hirata A, Murakami M, and Sakai H. Trimer of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand induces apoptosis in canine mammary tumor cells. *J. Vet. Med. Sci.* 81(12), 1791-1803, 2019
- (6) Arioka Y, Hirata A, Kushima I, Aleksic B, Mori D, Ozaki N. Characterization of a schizophrenia patient with a rare *RELN* deletion by combining genomic and patient-derived cell analyses. *Schizophrenia Res. in press*
- (7) Nakashima T, Kato K, Hatano Y, Hirata A, Okada H, Shibata T, Hara A. Specific deletion of p16^{INK4a} with retention of p19^{ARF} enhances the development of invasive oral squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol. in press*
- (8) Tashita C, Hoshi M, Hirata A, Kubo H, Nakamoto K, Hattori T, Yamamoto Y, Tomita H, Hara A, and Saito K. Kynurenine Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate-Induced Colitis in Mice. *World J. Gastroenterol.* 7;26(9):918-932. 2020
- (9) Kurihara T, Hirata A, Yamaguchi T, Okada H, Kameda M, Sakai H, Haridy M, Yanai T. Avipoxvirus infection in two captive Japanese cormorants (*Phalacrocorax capillatus*). *J. Vet. Med. Sci. in press*
2. 学会発表
- (1) 入澤祐太、平田暁大、酒井洋樹、今井俊夫：マウス正常組織由来オルガノイドの施設間輸送の最適条件の検討. 第 36 回日本毒性病理学会 (2020 年 2 月、東京)
- E. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

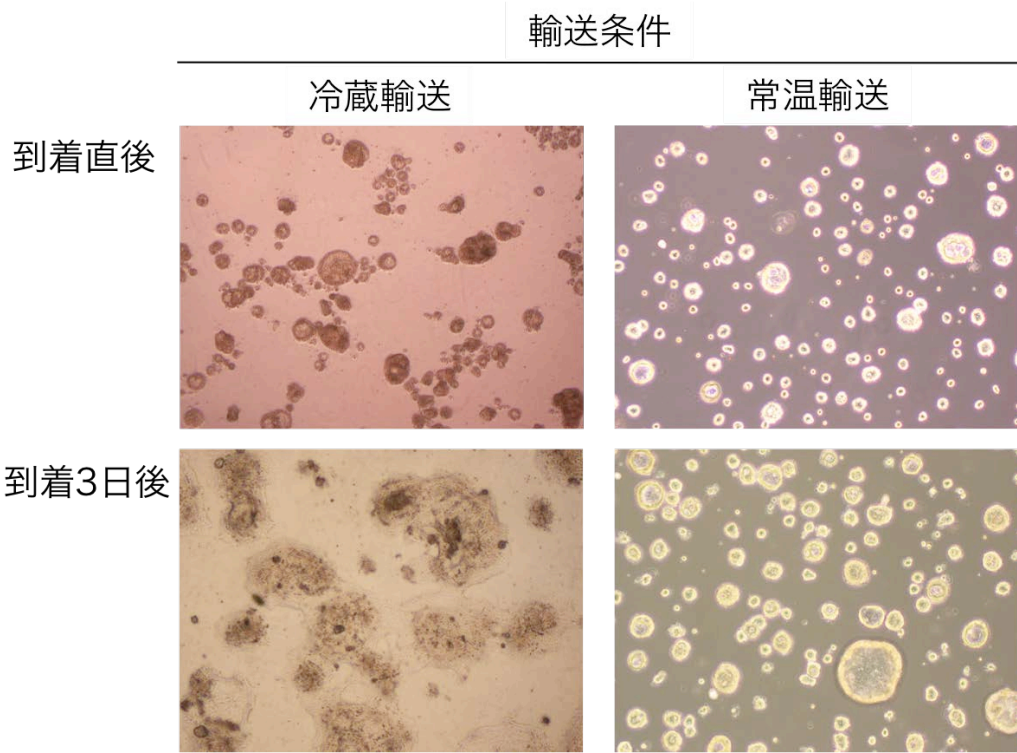


図1. 冷蔵輸送時と常温輸送時のオルガノイドの比較

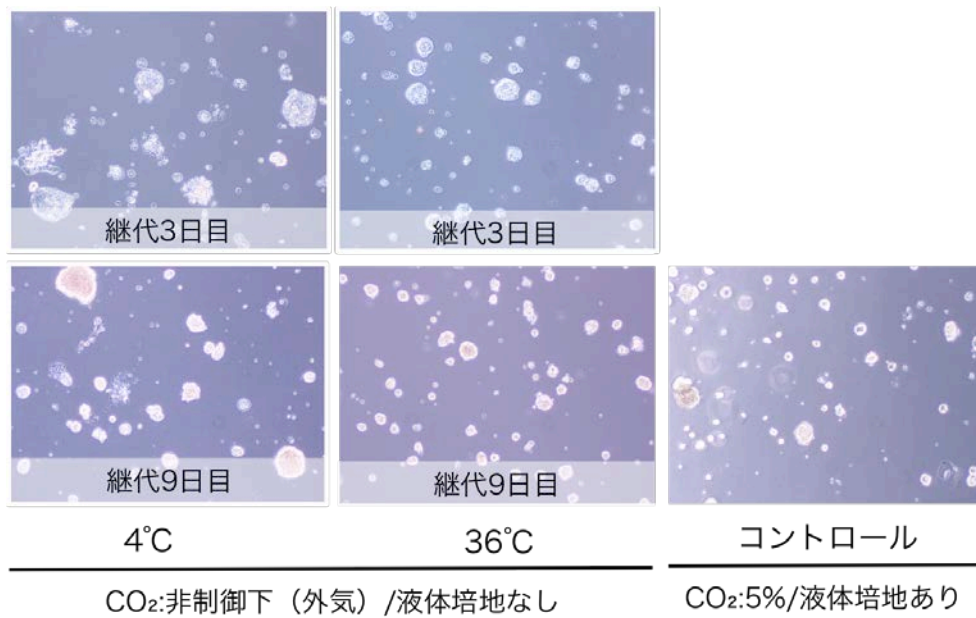


図2. 温度変化がオルガノイドに及ぼす影響

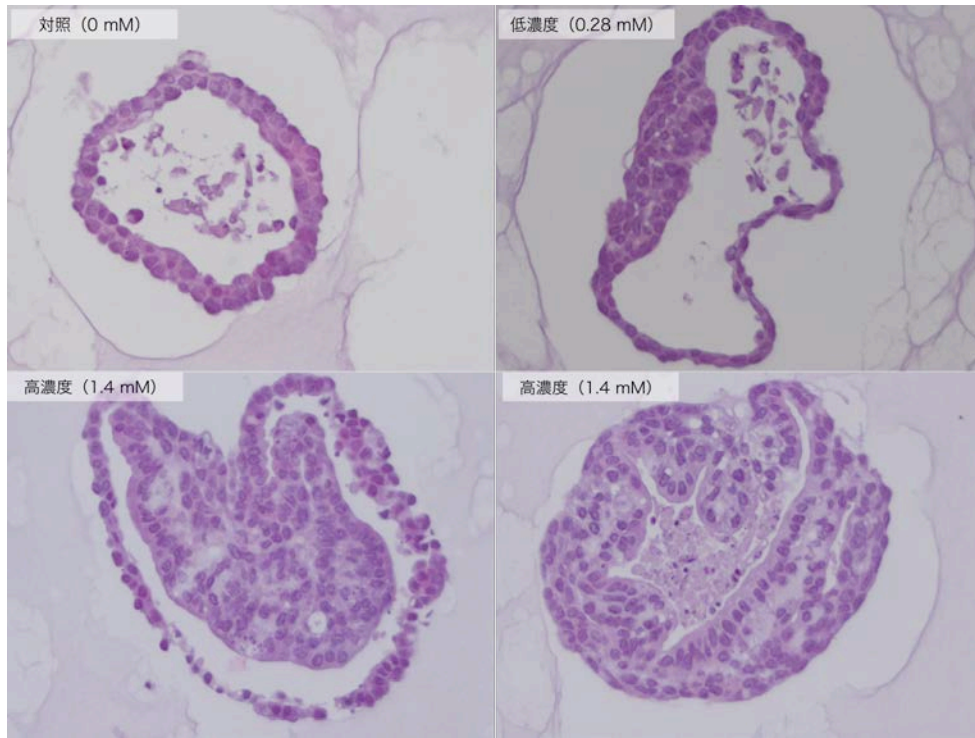


図3.アクリルアミド処置後のオルガノイドの形態変化



図4.アクリルアミド処置後のオルガノイドのヌードマウスにおける造腫瘍性の検討
(上段：ヌードマウス、下段：接種部組織)

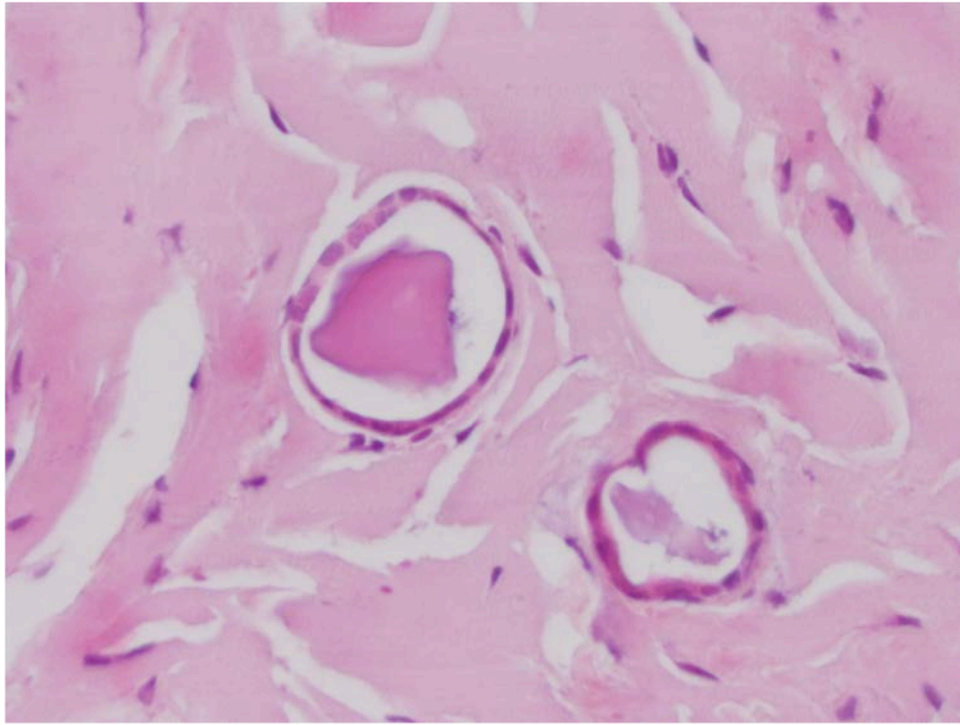


図5.ヌードマウス接種部の病理組織学的解析

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
なし							

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
Hasselgren C, Ahlberg E, Akahori Y, Amberg A, Anger LT, Atienzar F, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cronin MTD, Crooks I, Cross KP, Custer L, Dobo K, Doktorova T, Faulkner D, Ford KA, Fortin MC, Frericks M, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Barton-Maclaren TS, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Masten S, Miller S, Moudgal C, Muster W, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Schilter B, Snyder RD, Stavitskaya L, Stidl R, Szabo DT, Teasdale A, Tice RR, Trejo-Martin A, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Myatt GJ.	Genetic toxicology in silico protocol.	Regul Toxicol Pharmacol	107	doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104403.	2019

Petko I, Petkov, Chanita Kuseva, Stefan Kotov, Masamitsu Honma, Airi Kitazawa, Sunil Kulkarni, Terry W. Schultz, Ovanes G. Mekenyan.	Procedure for toxicological predictions based on mechanistic weight of evidences: Application to Ames mutagenicity.	Computational Toxicology	12	doi.org/10.1016/J.CO MTOX.2017.02.004	2019
Sassa A, Fukuda T, Ukai A, Nakamura M, Takabe M, Takamura-Enya T, Honma M, Yasui M.	Comparative study of cytotoxic effects induced by environmental genotoxins using XPC- and CSB-deficient human lymphoblastoid TK6 cells.	Genes Environ.	41	15	2019
Aoki Y, Matsumoto M, Matsumoto M, Masumura K, Nohmi T.	Mutant frequency is not increased in mice orally exposed to sodium dichromate.	Food Safety	7	2-10	2019
Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H.	Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5- δ]quinoline in F344 <i>gpt</i> delta transgenic rats.	Mutagenesis	34	279-287	2019
Lynch AM, Eastmond D, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Marchetti F, Masumura K, Pacchierotti F, Schuler M, Tweats D.	Targets and mechanisms of chemically induced aneuploidy. Part 1 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases.	Mutation Research	847	403025	2019
Pacchierotti F, Masumura K, Eastmond D, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Lynch AM, Schuler M, Tweats D, Marchetti F.	Chemically induced aneuploidy in germ cells. Part II of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases.	Mutation Research	848	403023	2019
T Tweats D, Eastmond DA, Lynch AM, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Marchetti F, Masumura K, Pacchierotti F, Schuler M.	Role of aneuploidy in the carcinogenic process: Part 3 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases.	Mutation Research	847	403032	2019
Hori H, Shimoyoshi S, Tanaka S, Momonami A, Masumura K, Yamada M, Fujii W, Kitagawa Y, Hayashi M.	Multiple-endpoint genotoxicity assay for colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine.	Mutation Research	849	503130	2020
Aoki Y, Taniguchi Y, Matsumoto M, Matsumoto M, Ohno M, Masumura K, Sasaki S,	Oxidative-stress-driven in vivo mutagenesis induced by oral administration of potassium bromate in the	Mutation Research	850-851	503136	2020

Tsuzuki T, Yamamoto M, Nohmi T.	small intestines of <i>gpt</i> delta mice.				
Naruse, M., Masui, R., Ochiai, M., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T.	An organoid-based carcinogenesis model induced by <i>in vitro</i> chemical treatment.	Carcinogenesis	In press	doi: 10.1093/carcin/bgaa011	2020
Matsuura, T., Maru, Y., Izumiya, M., Hoshi, D., Kato, S., Ochiai, M., Hori, M., Yamamoto, S., Tasuno, K., Imai, T., Aburatani, H., Nakajima, A., Hippo, Y.	Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis.	Carcinogenesis	In press	doi: 10.1093/carcin/bgz122	2020
Ochiai M, Yoshihara Y, Maru Y, Tetsuya M, Izumiya M, Imai T, Hippo Y.	Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids.	Carcinogenesis	40	1142-1152	2019
Machida Y, Sudo Y, Uchiya N, Imai T.	Increased susceptibility to mammary carcinogenesis and an opposite trend in endometrium in <i>Trp53</i> heterozygous knockout female mice by backcrossing the BALB/c strain onto the background C3H strain.	J. Toxicol. Pathol.	32	197-203	2019
Totsuka Y, Wakabayashi K.	Biological significance of aminophenyl- β -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review.	Mutation Res.	850-851	503148	2020
Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL.	High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT).	Mutation Res.	847	403022	2019
Totsuka Y, Lin Y, He Y, Ishino K, Sato H, Kato M, Nagai M, Elzawahry A, Totoki Y, Nakamura H, Hosoda F, Shibata T, Matsuda T, Matsushima Y, Song G, Meng F, Li D, Liu J, Qiao Y, Wei W, Inoue M, Kikuchi S, Nakagama H, Shan B.	DNA Adductome Analysis Identifies N-Nitrosopiperidine Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China.	Chem Res Toxicol.	32	1515-1527	2019
Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A,	Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles.	Carcinogenesis		doi: 10.1093/carcin/bgz120	2019

Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K.					
Sanada S, Suzuki T, Nagata A, Hashidume T, Yoshikawa Y, Miyoshi N.	Intestinal microbial metabolite sterco-bilin involvement in the chronic inflammation of <i>ob/ob</i> mice.	Sci. Rep.	10	6479	2020
Uchikawa M, Kato M, Nagata A, Sanada S, Yoshikawa Y, Tsunematsu Y, Sato M, Suzuki T, Hashidume T, Watanabe K, Yoshikawa Y, Miyoshi N.	Elevated levels of proinflammatory volatile metabolites in feces of high fat diet fed KK- <i>A^y</i> mice.	Sci. Rep.	10	5681	2020
Kawanishi M, Shimohara C, Oda Y, Hisatomi Y, Tsunematsu Y, Sato M, Hirayama Y, Miyoshi N, Iwashita Y, Yoshikawa Y, Sugimura H, Mutoh M, Ishikawa H, Wakabayashi K, Yagi T, Watanabe K.	Genotyping of a gene cluster for production of colibactin and in vitro genotoxicity analysis of <i>Escherichia coli</i> strains obtained from the Japan Collection of Microorganisms.	Genes and Environment	42	11	2020
Sarmales-Murga C, Akaoka F, Sato M, Takanishi J, Mino T, Miyoshi N, Watanabe K.	Novel class of dimeric product isolated from the fungus <i>Chaetomium globosum</i> : Evaluation of chemical structure and biological activity.	J. Antibiot.	73	320-323	2020
Kondo T, Saigo S, Ugawa S, Kato M, Yoshikawa Y, Miyoshi N, Tanabe K.	Prebiotic effect of fructooligosaccharides on the inner ear of DBA/2J mice with early-onset progressive hearing loss.	J Nutr Biochem.	75	108247	2020
Kawanishi M, Hisatomi Y, Oda Y, Shimohara C, Tsunematsu Y, Sato M, Hirayama Y, Miyoshi N, Iwashita Y, Yoshikawa Y, Sugimura H, Mutoh M, Ishikawa H, Wakabayashi K, Yagi T, Watanabe K.	In vitro genotoxicity analyses of colibactin-producing <i>E. coli</i> isolated from a Japanese colorectal cancer patient.	J Toxicol Sci.	44	871-876	2019
Hirayama Y, Tsunematsu Y, Yoshikawa Y, Tamafune R, Matsuzaki N, Iwashita Y, Ohnishi I, Tanioka F, Sato M, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K.	Activity-based probe for screening of high-colibactin producers from clinical samples.	Org Lett.	21	4490-4494	2019
Shimba Y, Togawa H, Senoo N, Ikeda M, Miyoshi N, Morita A,	Skeletal muscle-specific PGC-1 α overexpression suppresses	Sci. Rep.	9	4077	2019

Miura S.	atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice.				
Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K.	Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with o-toluidine and o-anisidine.	Arch. of Toxicol.	93	753-764	2019
Maru Y, Kawata A, Taguchi A, Ishii Y, Baba S, Mori M, Nagamatsu T, Oda K, Kukimoto I, Osuga Y, Fujii T, Hippo Y.	Establishment and molecular phenotyping of organoids from the squamocolumnar junction region of the uterine cervix.	Cancers	12	694	2020
Maru Y, Tanaka N, Ebisawa K, Odaka A, Sugiyama T, Itami M, Hippo Y.	Establishment and characterization of patient-derived organoids from a young patient with cervical clear cell carcinoma.	Cancer Sci.	110	2992-3005	2019
Maru Y, Hippo Y.	Current status of patient-derived ovarian cancer models.	Cells	8	doi: 10.3390/cells8050505	2019
Maru Y, Tanaka N, Itami M, Hippo Y.	Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors.	Gynecol. Oncology	154	189-198	2019
Maru Y, Onuma K, Ochiai M, Imai T, Hippo Y.	Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoid.	Cancer Sci.	110	858-866	2019
Hirata A, Hatano Y, Niwa M, Hara A, and Tomita H.	Heterogeneity in Colorectal Cancer Stem Cells.	<i>Cancer Prev. Res.</i>	12	413-420	2019
Hirata A, Miyamoto Y, Kaneko A, Sakai H, Yoshizaki K, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, and Suzuki J.	Hepatic Neuroendocrine Carcinoma in a Japanese Macaques (<i>Macaca fuscata</i>).	J. Med. Primatol.	48	137-140	2019
Hirata A, Kaneko A, Sakai H, Nakamura S, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, Suzuki J.	T-cell/Histiocyte-rich Large B-cell Lymphoma of the Larynx in a Juvenile Japanese Macaque (<i>Macaca fuscata</i>).	J. Comp. Pathol.	169	1-4	2019
Kanayama T, Tomita H, Binh NH, Hatano Y, Aoki H, Okada H, Hirata A, Fujihara Y, Kunisada T, and Hara A.	Characterization of a BAC transgenic mouse expressing <i>Krt19</i> -driven iCre recombinase in its digestive organs.	PLoS One	14	e0220818	2019
Goto M, Hirata A, Murakami M, and Sakai H.	Trimer of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand induces apoptosis in canine mammary tumor cells.	J. Vet. Med. Sci.	81	1791-1803	2019

Arioka Y, Hirata A, Kushima I, Aleksic B, Mori D, Ozaki N.	Characterization of a schizophrenia patient with a rare RELN deletion by combining genomic and patient-derived cell analyses.	Schizophrenia Res.	In press	doi: 10.1016/j.schres.2019.10.038	2019
Nakashima T, Kato K, Hatano Y, Hirata A, Okada H, Shibata T, Hara A.	Specific deletion of p16 ^{INK4a} with retention of p19 ^{ARF} enhances the development of invasive oral squamous cell carcinoma.	Am. J. Pathol.	In press	doi: 10.1016/j.ajpath.2020.01.017	2020
Tashita C, Hoshi M, Hirata A, Kubo H, Nakamoto K, Hattori T, Yamamoto Y, Tomita H, Hara A, and Saito K.	Kynurenine Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate-Induced Colitis in Mice.	World J. Gastroenterol.	26	918-932	2020
Kurihara T, Hirata A, Yamaguchi T, Okada H, Kameda M, Sakai H, Haridy M, Yanai T.	Avipoxvirus infection in two captive Japanese cormorants (Phalacrocorax capillatus).	J. Vet. Med. Sci.	In press	doi: 10.1292/jvms.19-0406	2020

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏

次の職員の令和元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については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30-食品-一般-003)

3. 研究者名 (所属部局・職名) 変異遺伝部 部長 (氏名・フリガナ) 本間 正充 (ホンマ マサミツ)

4. 倫理審査の状況

Table with 5 columns: 該当性の有無 (有/無), 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) (審査済み, 審査した機関, 未審査 (※2)), and 5 rows of ethical guidelines.

(※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

Table with 2 columns: 研究倫理教育の受講状況, 受講 [x] 未受講 []

6. 利益相反の管理

Table with 2 columns: 管理項目 (COI management), 有 [x] 無 [] (理由)

(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。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴久

次の職員の令和元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について以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏

次の職員の令和元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便性について
は以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元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...
ては以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30 食品一般-003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター 病理部 客員研究員
(氏名・フリガナ) 西川 秋佳 (ニシカワ アキヨシ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴彦

次の職員の令和元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について
ては以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30 食品一般-003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター病理部 部長
(氏名・フリガナ) 小川 久美子 (オガワ クミコ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、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。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元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
ては以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30 食品一般・003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター病理部 室長
(氏名・フリガナ) 石井 雄二 (イシイ ユウジ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元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...
ては以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30 食品一般・003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター病理部 主任研究官
(氏名・フリガナ) 高須 伸二 (タカス シンジ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

(留意事項) ・該当する□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。

2020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

次の職員の令和元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の管理については以下のとおりです。

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

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

(※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。

2020年4月1日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法 ンター

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 中金 齊 印

次の職員の令和元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... については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

(※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。

2020年4月1日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法人国

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 中金 斉

次の職員の令和元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衝突管理状況については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 静岡県立大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 鬼頭 宏

次の職員の平成31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関については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

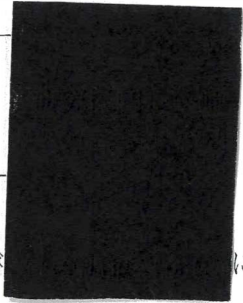
6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 千葉県がんセンター
 所属研究機関長 職 名 病院長
 氏 名 飯笹 俊彦



次の職員の平成31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
 については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項) DNA 組み替えおよび動物実験に関する研究計画は機関の承認を得ております

(※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) ・該当する口にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人東海国立大学機構

所属研究機関長 職名 機構長

氏名 松尾清

次の職員の令和元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
ては以下のとおりです。

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

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、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。