

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鱒淵 英機

令和2年（2020）年 5月

## 目 次

I . 総括研究報告	
化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究	----- 1
鰐淵英機	
II . 分担研究報告	
1 . 病理組織発がんマーカーを用いた中期発がんリスク評価法の確立： 膀胱発がん物質の評価	----- 10
豊田武士	
2 . 病理組織発がんマーカーを用いた中期発がんリスク評価法の確立： 膀胱発がん物質の評価	----- 14
鈴木周五	
3 . 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立： 肝発がん物質の評価	----- 17
鰐淵英機	
4 . 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立： 肝発がん物質の評価	----- 20
魏 民	
5 . 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立： 肝発がん物質の評価	----- 23
横平政直	
6 . 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立： 肝発がん物質の評価	----- 26
塚本徹哉	
7 . 網羅的なDNA付加体解析法を用いた化学物質のDNA損傷性評価： 肝発がん物質の評価	----- 28
戸塚ゆ加里	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 33

## 研究要旨

本研究は化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化を可能とする評価モデルの構築を目指し、 $\gamma$ -H2AXを用いた短期膀胱発がんリスク評価法の確立及び遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性の検証を行った。「膀胱における $\gamma$ -H2AX免疫染色」を、28日間反復経口投与毒性試験に対する既存のOECDテストガイドライン（TG 407）に、オプションとして追加する改定案（Standard Project Submission Form; SPSF）に対して、OECD加盟国・機関からのレビューコメントを頂き、非発がん物質の評価が不足していること、 $\gamma$ -H2AXの用量相関性が不明であることを指摘された。そのため本年度は、 $\gamma$ -H2AXを用いた短期膀胱発がんリスク評価法では、膀胱非発がん物質を中心に10物質について、ラットを用いた28日間反復経口投与試験を実施した。これまでに蓄積された65物質のデータを総合すると、 $\gamma$ -H2AX免疫染色によって化学物質のラット膀胱に対する発がん性を、感度82.9%（29/35）及び特異度100%（30/30）と、高い精度で予測できることが示された。また、遺伝毒性及び非遺伝毒性膀胱発がん物質2種を用いて、 $\gamma$ -H2AX形成が明瞭な用量相関性を示すことを確認した。遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性の検証では、これまでの検討で偽陰性となった6物質について濃度を上げて検討した結果、6物質のうち2物質が陽性となった。これまでに取得した60物質のデータを総合すると、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度82.6%（19/23）及び特異度97.3%（36/37）と、高い精度で検出できる可能性が示唆された。さらに、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルで用いた29物質の肝組織を用いたDNAアダクトーム解析による評価を行った結果、主成分分析により遺伝毒性及び肝発がん物質の分類が明瞭に出来た。また、毒性予測モデルを作成し検討した結果、遺伝毒性については感度100%（11/11）及び特異度88.9%（16/18）、肝発がん性については感度90.0%（9/10）及び特異度100%（19/19）と高い予測性を示した。

## 研究分担者

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

## A. 研究目的

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

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

2019年度は、OECDからの評価結果に対応するために、非膀胱発がん物質での検討として、膀胱発がん物質2種類および非膀胱発がん物質8種類（国立衛研/豊田、大阪市立大/鈴木）についてラット28日間反復投与試験を実施し、 $\gamma$ -H2AXの膀胱発がん性早期検出指標としての有用性を検証した。また、OECDからの評価結果に対応として、 $\gamma$ -H2AXの陽性率と用量相関性について検

討した。我々が構築した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性の検証では、前年度までの結果の中で偽陰性物質 6 種類に着目し、より投与濃度を上げることで陽性となるか検証した（大阪市立大/鰐淵・魏、香川大/横平、藤田医科大/塚本）。さらに、DNA アダクトーム解析を用いて化学物質の DNA 損傷を指標とした安全性評価法を確立するために、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルで得られた肝臓組織を用いて化学物質の投与に相関する付加体群について検討した（国立がん研究センター/戸塚、大阪市立大/鰐淵）。

## B. 研究方法

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

国立衛研担当分として、非膀胱発がん物質 5 種：Ethionamide (ETP)、2,6-Diaminotoluene (2,6-DAT)、5-Fluorouracil (5-FU)、6-Mercaptopurine (6-MP)、Ampicillin (AMP) を、6 週齢の雄 F344 ラットに 28 日間経口投与した。各物質の投与濃度/経路は、報告されている発がん性試験の方法に基づき、0.3% ETP、0.1% 2,6-DAT、0.01% 6-MP 混餌、0.0125% 5-FU 飲水投与、1 g/kg AMP 強制胃内投与した。

大阪市立大担当分として、膀胱発がん物質 2 種：Pioglitazone (PGZ)、Sodium arsenite (NaAsO<sub>2</sub>)、非膀胱発がん物質 3 種：Rosiglitazone (RGZ)、1-Nitropropane (1-NP)、8-Hydroxyquinoline (8-HQ) を、6 週齢の雄 F344 ラットに 28 日間投与した。各物質の投与濃度/経路は、報告されている発がん性試験の方法に基づき、16 mg/kg PGZ、50 mg/kg RGZ、45 mg/kg 1-NP 強制胃内投与、173 ppm NaAsO<sub>2</sub>、0.3% 8-HQ 混餌投与した。

用量相関性の検討として、6 週齢の雄 F344 ラットに遺伝毒性膀胱発がん物質である *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) または非遺伝毒性膀胱発がん物質であるメラミンをそれぞれ 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.02, 0.05% (飲水) および 0, 0.3, 1, 3% (混餌) の用量で 2 日または 4 週間投与した。

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

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

偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質 6 種（表 1）(Benzidine (BZ), Hydrazine (HZ), 4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA), Dichloroacetic acid (DCA), Vinyl bromide (VB), Hydrazine sulfate (HS)) について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。投与濃度（各物質の LD50 の 1/2 および 1/3）を用いた。動物試験は 3 施設（香川大・藤田医科大・大阪市立大）で行われた。実験動物は 6 週齢の雄 SD ラットを用いた。動物試験プロトコールは事前に共有・配布し、プロトコールに従い試験を実施した。

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

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

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

表 1 令和元年度に検討した遺伝毒性肝発がん物質

被験物質	TD50	投与量		判定結果	正否
	(mg/kg/day)	(mg/kg)	Dose/LD50		
Benzidine (BZ)	1.73	150	1/2	Negative	×
		210	2/3	Negative	×
Hydrazine (HZ)	0.613	30	1/2	Negative	×
		40	2/3	Negative	×
4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)	9.51	360	1/2	Negative	×
		480	2/3	Negative	×
Vinyl bromide (VB)	18.5	250	1/2	Negative	×
		330	2/3	Negative	×
Dichloroacetic acid (DCA)	161	1410	1/2	Negative	×
		1880	2/3	Positive	○
Hydrazine sulfate (HS)	40.8	300	1/2	Positive	○
		400	2/3	Positive	○

### 3. DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価（鰐淵、戸塚）

遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの検証試験で遺伝毒性肝発がん物質 8 種

(*o*-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 4,4'-Thiodianiline (TDA), *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-Nitrosodiethanolamine (NDELA), *N*-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), Nitrosodibutylamine (NB), *N*-Nitrosopyrrolidine (NNP))、遺伝毒性非肝発がん物質 3 種 (Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT))、非遺伝毒性肝発がん物質 2 種 (Monocrotaline (MCT), Phenobarbital (PB))、非遺伝毒性非肝発がん物質 16 種 (Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI), Indomethacin (IM), Phenylbutazone (PhB), Promethazine (PMZ), Sulindac (SUL), Tetracycline (TC), Ethionamide (ETH), Theophy

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

次に、得られたデータから、対照群である 2-NP および MC を除いた、146 サンプルのデータを用いた。各曝露群について、全データの 3/4 を訓練データに、残りの 1/4 をテストデータに、それぞれ分配し、機械学習の訓練データおよびテストデータの作成を行った。遺伝毒性、肝発がん性、遺伝毒性/肝発がん性を付加体から予測するモデルを、教師あり機械学習手法を用いて試作した。学習アルゴリズムとしては、ランダムフォレストを使用した。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

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

化学物質の膀胱発がん性早期検出を目的とした「膀胱における  $\gamma$ -H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与毒性試験に対する既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に、オプションとして追加する改定案を厚生労働省を通じて提出した (図 1)。その結果、OECD 加盟国・機関からのレビューコメントとして、非膀胱発がん物質での検討数および  $\gamma$ -H2AX 陽性率の用量相関性への懸念を受け、その対応が必要となった。

そこで今年度の成果として、膀胱粘膜上皮細胞における  $\gamma$ -H2AX 形成を免疫組織化学的に検索した結果、膀胱発がん物質 NaAsO<sub>2</sub> で陽性率の有意な増加が認められた一方で、PGZ では差がなかった。非膀胱発がん物質 8 種については、対照群と差がなかった。

これまでに行った計 65 物質について、遺伝毒性膀胱発がん物質 22 種、非遺伝毒性膀胱発がん物質 13 種のうち、それぞれ 20 種および 9 種の投与群において、 $\gamma$ -H2AX 陽性率の検討により検出可能であった。膀胱を標的としない発がん物質および非発がん物質については、検索した 30 種すべてが陰性であった。以上より、 $\gamma$ -H2AX 陽性率を指標とした膀胱発がん物質検出の感度は 82.9% (29/35)、特異度は 100% (30/30) であった (図 2)。

**OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME**  
**Standard Project Submission Form**

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

---

**PROJECT TITLE**

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

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

Japan

**DATE OF SUBMISSION TO THE SECRETARIAT**

31 October 2018

---

**DETAILS OF LEAD COUNTRY/CONSORTIUM**

<b>Country / Organisation:</b>	Japan
<b>Agency/Ministry/Other:</b>	National Institute of Health Sciences, NIHS / Ministry of Health, Labour and Welfare, MHLW
<b>Mail Address:</b>	NIHS: 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan MHLW: 1-2-2 Kasumigasaka, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8916, Japan
<b>Phone/fax:</b>	NIHS: (phone) +81-44-270-6651, (fax) +81-44-270-6655/ MHLW: (phone) +81-3-3535-2298
<b>Email:</b>	NIHS: ttoyoda@nihs.go.jp MHLW: tsukano-masaaki12@mhlw.go.jp

図 1. 既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に、 $\gamma$ -H2AX 免疫染色による膀胱発がん性早期検出法の追加を提案する SPSF (表紙) (厚生労働省を通じて提出)

**ラット膀胱に対する発がん性**

		+	-
<b>膀胱上皮における <math>\gamma</math>-H2AX 形成</b>	<b>+</b>	<b>29</b> 2-NA, 2-AAF, BCPN, BBN, o-Anisidine, DHPN, EBN, APNH, p-Cre, COP, PEITC, DMAB, CPA, 2-NT, o-Toluidine, BOP, DB1, MNU, TBP, Carbaryl, Melamine, Uracil, NTA, ADBAQ, PNC, AUDA, SOPP, NDPA, iAs(III)	<b>0</b>
	<b>-</b>	<b>6</b> ANP, NMOR, DMA, m-Cre, SSZ, PGZ	<b>30</b> DMN, 2,4-Xylidine, PhIP, DMBA, Glycidol, MNNG, 2-NP, 4NQO, ENU, DMH, DEN, DMB, TBPP, KBrO <sub>3</sub> , AA, p-Toluidine, 2,6-DAT, 5-FU, 6-MP, Aniline, $\alpha$ -Limonene, DEHP, DO, TAA, CBX, AMP, ETP, 8-HQ, RGZ, 1-NP

**感度 = 82.9% (29/35)、特異度 = 100% (30/30)**

図 2.  $\gamma$ -H2AX 形成を指標としたラット膀胱発がん性の検出感度および特異度

BBN・メラミンの複数用量による検討では、4 週時点で、BBN の 0.01% 以上投与群およびメラミンの 3% 投与群で過形成等の病理組織学的変化が認められた。膀胱粘膜における  $\gamma$ -H2AX 陽性率は、BBN およびメラミン投与群で 2 日・4 週いずれの時点でも用量依存的に有意に増加した (図 3, 4)。

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

各施設で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った (表 1)。本モデルでは、遺伝毒性肝発がん物質を「陽性」、その他の物質を「陰性」と判定する。偽陰性であった 6 物質のうち、HS については、LD50 の 1/2 および 2/3 投与量で、DCA については LD50 の 2/3 投与量で、陽性となった。

60 物質での結果は、感度 82.6%(19/23)、特異度 97.3%(36/37)となった。

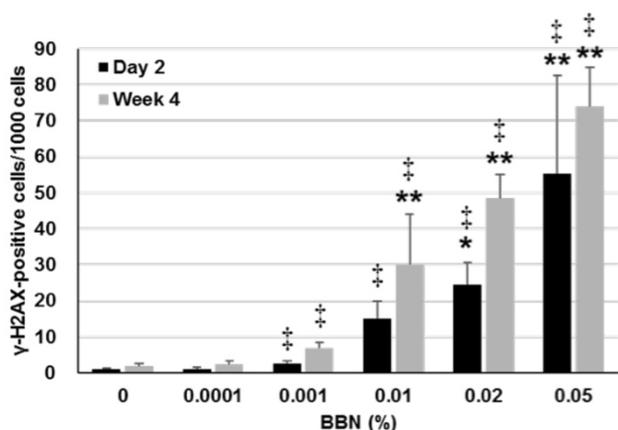


図 3. BBN 投与ラット膀胱粘膜上皮における  $\gamma$ -H2AX 陽性率。  
\*\*;  $P < 0.01$  (Dunnett 多群検定), †;  $P < 0.01$  (Janckheere 傾向検定)

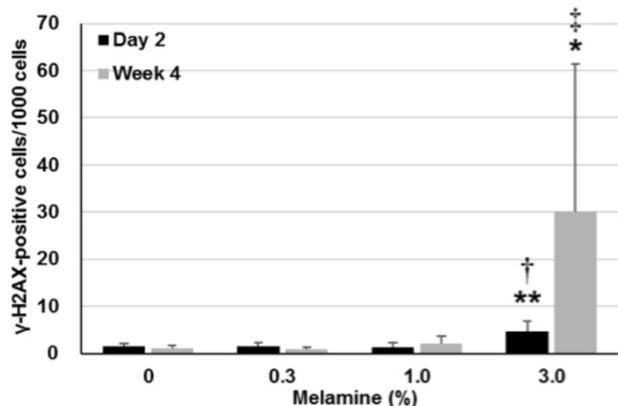


図 4. メラミン投与ラット膀胱粘膜上皮における  $\gamma$ -H2AX 陽性率。  
\*\*;  $P < 0.05/0.01$  (Dunnett 多群検定), †/‡;  $P < 0.05/0.01$  (Janckheere 傾向検定)

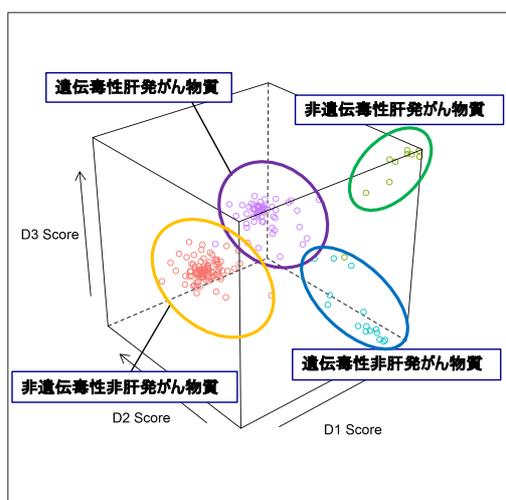


図 5. 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価 (LDA 解析による)

### 3. DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価 (鰐淵、戸塚)

各種化学物質を投与したラット肝臓 DNA のアダクトーム解析を行なった結果を図 5 に示す。LDA 解析を行なったところ、遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質の 4 つのグループに綺麗に分離されることがわかった。

遺伝毒性について検討した結果、MCT および PB 以外は全て予測でき、感度 100% (11/11)、特異度 88.9% (16/18)の結果が得られた。また、肝発がん性の予測結果は、MCT 以外は全て予測でき、感度 90% (9/10)、特異度 100% (19/19)の結果が得られた。

遺伝毒性および肝発がん性の予測結果を、表 2 にまとめた。MCT および PB 以外は、全て予測できており、遺伝毒性および肝発がん性に高い予測性を示した

表 2. DNA アダクトーム解析による遺伝毒性/肝発がん性評価

実際の分類	解析結果			
	+/+	+/-	-/+	-/-
+/+	8	0	0	0
+/-	0	3	0	0
-/+	1	1	0	0
-/-	0	0	0	16

### D. 考察

これまでの検討結果から、 $\gamma$ -H2AX 免疫染色によって化学物質のラット膀胱に対する発がん性を、感度 82.9% (29/35) および特異度 100% (30/30) と、28 日という短期間の試験で高い精度で予測できることが示された。

「膀胱における  $\gamma$ -H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与毒性試験に対する既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に追加する改定案 (Standard Project Submission Form; SPSF) を、平成 30 年 11 月に厚生労働省を通じて提出した。本改定案は化学物質の膀胱発がん性早期検出を目的として、膀胱を用いた  $\gamma$ -H2AX 免疫染色をオプションとして追加するものである。免疫染色は多くの研究機関で実施されている一般的な解析手法であり、既存の試験への組み込みが容易である。また、早期に発がん性を検出することで、不要な長期がん原性試験の実施を回避でき、実験動物の 3R にも貢献し得る。提出した改定案に対し、OECD 加盟国・機関から多くのレビューコメントを頂いた。今年度はこれらの指摘のうち、非発がん物質の評価が不足していることおよび  $\gamma$ -H2AX の用量相関性が不明であることへの対応を実施した。非発がん物質を中心に新たに 10 物質の検討を行い、遺伝毒性および非遺伝毒性膀胱発がん物質の代表として、それぞれ BBN およびメラミンを用いて、 $\gamma$ -H2AX 形成が明瞭な用量相関性を示すことを確認した。

遺伝毒性肝発がん物質検出モデルの検証では、偽陰性となった 6 物質のうち、HS が LD50 の 1/2 および 2/3 投与時に、DCA が LD50 の 2/3 投与時に陽性と判定された。これまでに取得した 60 物質に対して、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度 82.6%(19/23) および特異度 97.3%

(36/37) と、高い精度で検出できる可能性が示唆された。

29種の遺伝毒性/非遺伝毒性・肝発がん/非肝発がん物質を投与したラットの肝臓からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅解析を行なった。得られたデータを用いてLDA解析を行った。その結果、遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質の4つのグループに分離できた。アダクトームデータの一部を教師データとして化学物質の遺伝毒性/肝発がん性を予測するモデルを機械学習手法を用いて試作した。試作された遺伝毒性/肝発がん性予測モデルを用いてテストデータに対して予測を行ったところ、93%以上の正解率が得られた。予測精度をさらに向上させるためには、説明変数の加工、学習アルゴリズムの変更、チューニングなどの学習方法を改良する必要がある。さらに、訓練データの増加も必要であると思われる。特に、今回、いずれの予測モデルにおいても予測に失敗した化学物質物質 (MCT, PB) は、非遺伝毒性肝発がん物質である。この結果は、データが他の化学物質に比べ極端に少ないことが予測度を低くしている可能性を示唆している。今回、この2種しか非遺伝毒性肝発がん物質の暴露は行なっておらず、同カテゴリーのサンプルを追加することが、予測精度を上げるためにも重要であると考えられる。

## E. 結論

本研究の結果から、 $\gamma$ -H2AX免疫染色は、化学物質の膀胱発がん性早期検出マーカーとして応用できることが示された。提出したガイドライン改定案について、OECDワーキンググループ (Working Group of the National Coordinators for the Test Guidelines Programme; WNT) からの指摘に対して、検討化学物質数の増加および用量相関性を検証した。今後もコメント対応を継続し、短期試験による発がん性評価手法としての有効性を高めていく予定である。

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

DNAアダクトーム解析を用いて化学物質のDNA損傷を指標とした化学物質の肝発がん性・遺伝毒性への分類、遺伝毒性および肝発がん性の予測が可能となる結果を示した。各グループの予測に重要な付加体の探索を行うと同時に、更に化学物質の数を増やし、予測精度の向上について検討を行う予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. *Toxicology*. (In press).
- 2) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T,

- Ogawa K. Dose dependency of  $\gamma$ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with genotoxic and nongenotoxic bladder carcinogens. *J Appl Toxicol*. (In press).
- 3) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H: Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol*. 2020; 94: 927-37.
  - 4) 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, and Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis*. 2020; 41 (3): 368-376.
  - 5) Furihata C, You X, Toyoda T, Ogawa K, Suzuki T. Using FFPE RNA-Seq with 12 marker genes to evaluate genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens. *Genes Environ*. 2020; 42: 15.
  - 6) Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl- $\beta$ -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of  $\beta$ -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review. *Mutation Res*. 2020; 850-851: 503148.
  - 7) Teramoto A, Tsukamoto T, Yamada A, Kiriyama Y, Imaizumi K, Saito K, Fujita H, Deep learning approach to classification of lung cytological images: Two-step training using actual and synthesized images by progressive growing of generative adversarial networks. *PLoS One*. 2020; 15: e0229951.
  - 8) Yukimatsu N, Gi M, Okuno T, Fujioka M, Suzuki S, Kakehashi A, Yanagiba Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, Wanibuchi H. Promotion effects of acetoaceto-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Arch Toxicol*. 2019; 93: 3617-3631.
  - 9) Yoshida K, Gi M, Fujioka M, Teramoto I, Wanibuchi H. Long-term administration of excess zinc impairs learning and memory in aged mice. *J Toxicol Sci*. 2019; 44: 681-691.
  - 10) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Tago Y, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in the drinking water of C57BL/6J mice for 52 weeks. *J Toxicol Pathol*. 2019; 32: 127-134.
  - 11) Takakuwa T, Okuno T, Nishimoto M, Nanno S, Takeoka Y, Nakashima Y, Koh H, Nakane T, Wanibuchi H, Hino M, Nakamae H. [Refractory ascites caused by lymphatic flow disorder after

- stem cell transplantation for acute myeloid leukemia]. *Rinsho Ketsueki*. 2019; 60: 12-16.
- 12) Osawa T, Shimamura T, Saito K, Hasegawa Y, Ishii N, Nishida M, Ando R, Kondo A, Anwar M, Tsuchida R, Hino S, Sakamoto A, Igarashi K, Saitoh K, Kato K, Endo K, Yamano S, Kanki Y, Matsumura Y, Minami T, Tanaka T, Anai M, Wada Y, Wanibuchi H, Hayashi M, Hamada A, Yoshida M, Yachida S, Nakao M, Sakai J, Aburatani H, Shibuya M, Hanada K, Miyano S, Soga T, Kodama T. Phosphoethanolamine Accumulation Protects Cancer Cells under Glutamine Starvation through Downregulation of PCYT2. *Cell Rep*. 2019; 29: 89-103 e107.
  - 13) Okuno T, Yashiro M, Masuda G, Togano S, Kuroda K, Miki Y, Hirakawa K, Ohsawa M, Wanibuchi H, Ohira M. Establishment of a New Scirrhous Gastric Cancer Cell Line with FGFR2 Overexpression, OCUM-14. *Ann Surg Oncol*. 26: 2019; 1093-1102.
  - 14) Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, Wanibuchi H. Acetoaceto-o-Toluidide Enhances Cellular Proliferative Activity in the Urinary Bladder of Rats. *Toxicol Sci*. 2019; 169: 456-464.
  - 15) Ohira T, Kojima H, Kuroda Y, Aoki S, Inaoka D, Osaki M, Wanibuchi H, Okada F, Oshimura M, Kugoh H. PITXI protein interacts with ZCCHC10 to regulate hTERT mRNA transcription. *PLoS One*. 2019; 14: e0217605.
  - 16) 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.
  - 17) Suzuki S, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Akagi JI, Cho YM, Ogawa K, Takahashi S. Dimethylarsinic acid may promote prostate carcinogenesis in rats. *J Toxicol Pathol*. 2019; 32: 73-7.
  - 18) Okabe A, Kiriya Y, Suzuki S, Sakurai K, Teramoto A, Kato H, Naiki-Ito A, Tahara S, Takahashi S, Kuroda M, Sugioka A, Tsukamoto T. Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker gamma-H2AX. *J Toxicol Pathol*. 2019; 32: 91-9.
  - 19) Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Takase H, Hirose A, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. *Cancer Sci*. 2019; 110: 2485-92.
  - 20) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Cyclohexanone curcumin analogs inhibit the progression of castration-resistant prostate cancer in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 2019; 110: 596-607.
  - 21) Kobayashi M, Inaguma S, Raffeld M, Kato H, Suzuki S, Wakasugi T, Mitsui A, Kuwabara Y, Lasota J, Ikeda H, Miettinen M, Takahashi S. Epithelioid variant of gastrointestinal stromal tumor harboring PDGFRA mutation and MLH1 gene alteration: A case report. *Pathol Int*. 2019; 69: 541-6.
  - 22) Etani T, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki T, Iida K, Nozaki S, Kato H, Nagayasu Y, Suzuki S, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. NCLI, A Highly Selective Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apoptosis and Autophagy. *J Clin Med*. 2019; 8: 442.
  - 23) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Comprehensive expression analysis of mRNA and microRNA for investigation of compensatory mechanisms in the rat kidney after unilateral nephrectomy. *J Appl Toxicol*. 2019; 132: 110643.
  - 24) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of vanillin propylene glycol acetal in F344 rats. *Food Chem Toxicol*. 2019; 132: 110643.
  - 25) Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and  $\gamma$ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with *o*-toluidine and *o*-anisidine. *Arch Toxicol*. 2019; 93: 753-62.
  - 26) Toyoda T, Cho YM, Matsushita K, Tachibana S, Senuma M, Akagi J, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of hexyl acetate in SD rats. *J Toxicol Pathol*. 2019; 32: 205-12.
  - 27) Sone M, Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Morikawa T, Nishikawa A, Ogawa K. Immunohistochemistry of  $\gamma$ -H2AX as a method of early detection of urinary bladder carcinogenicity in mice. *J Appl Toxicol*. 2019; 39: 868-76.
  - 28) Yang Q, Yasuda T, Choi E, Toyoda T, Roland JT, Uchida E, Yoshida H, Seto Y, Goldenring JR, Nomura S. MEK inhibitor reverses metaplasia and allows re-emergence of normal lineages in *Helicobacter pylori*-infected gerbils. *Gastroenterology*. 2019; 156: 577-81.
  - 29) Hirata T, Cho YM, Suzuki I, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate

- (MTBITC) induced apoptotic cell death and G2/M cell cycle arrest via ROS production in human esophageal epithelial cancer cells. *J Toxicol Sci.* 2019; 44: 73-81.
- 30) Funahashi S, Okazaki Y, Nagai H, Chew SH, Ogawa K, Toyoda T, Cho YM, Toyokuni S. Twist1 was detected in mesenchymal cells of mammary fibroadenoma and invasive components of breast carcinoma in rats. *J Toxicol Pathol.* 2019; 32: 19-26
  - 31) Nakagawa M, Sakai Y, Kiriya Y, Tahara T, Horiguchi N, Okabe A., Tahara S, Shibata T, Ohmiya N, Kuroda M, Sugioka A, Tsukamoto T. Eradication of *Helicobacter pylori* Induces Immediate Regressive Changes in Early Gastric Adenocarcinomas. *Pathobiology.* 2019; 86: 135-144.
  - 32) Okabe A, Kiriya Y, Suzuki S, Sakurai K, Teramoto A, Kato H, Naiki-Ito A, Tahara S, Takahashi S, Kuroda M, Sugioka A, Tsukamoto T. Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker gamma-H2AX. *J Toxicol Pathol.* 2019; 32: 91-99.
  - 33) Tahara S, Tahara T, Horiguchi N, Kato T, Shinkai Y, Yamashita H, Yamada H, Kawamura T, Terada T, Okubo M, Nagasaka M, Nakagawa Y, Shibata T, Yamada S, Urano M, Tsukamoto T, Kurahashi H, Kuroda M, Ohmiya N. DNA methylation accumulation in gastric mucosa adjacent to cancer after *Helicobacter pylori* eradication. *Int J Cancer.* 2019; 144: 80-88.
  - 34) 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; 32 (8): 1515-1527.
  - 35) 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; 847: 403022.
2. 学会発表
- 1) 魏民、梯アンナ、鈴木周五、梯アンナ、山口貴嗣、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による肝発がん作用. 第36回日本毒性病理学会総会、東京 (2020年2月)
  - 2) 梯アンナ、石井直美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機. NASH肝臓発がんにおける新規マーカー候補分子の同定. 第36回日本毒性病理学会総会、東京 (2020年2月)
  - 3) 行松直、魏民、梯アンナ、鈴木周五、鰐淵英機. ラットにおけるBBN誘発膀胱発がんに対するo-Acetoacetotoluidideの促進効果. 第36回日本毒性病理学会総会、東京 (2020年2月)
  - 4) 豊田武士、山田貴宣、井手鉄哉、松下幸平、森川朋美、小川久美子. F344ラットの小腸に認められた神経筋血管過誤腫の一例. 第7回日本獣医病理学専門家協会学術集会、宮崎 (2020年3月)
  - 5) Toyoda T, Yamada T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Mucosal damage and  $\gamma$ -H2AX formation in the rat urinary bladder induced by aromatic amines with structures similar to that of o-toluidine. 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Anaheim (2020.3)
  - 6) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤木純一、曹永晩、森川朋美、小川久美子. 腎発がん物質早期検出指標としての $\gamma$ -H2AXの応用可能性: 至適評価時点の検討. 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2020年2月)
  - 7) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、小川久美子. 病理学的手法による膀胱発がん性の早期検出および機序解明. 第2回医薬品毒性機序研究会、川崎 (2020年1月)
  - 8) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Dose- and time-dependent formation of  $\gamma$ -H2AX, a biomarker for early detection of bladder carcinogens, and its potential role in tumorigenesis in the rat urinary bladder. 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Anaheim (2020.3)
  - 9) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、井手鉄哉、西川秋佳、小川久美子. 肝発がん物質投与ラット肝臓における $\gamma$ -H2AX陽性細胞率の検討. 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2020年2月)
  - 10) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 急性腎障害から慢性腎臓病への進展を早期に予測する新規評価分子の探索. 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2020年2月)
  - 11) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子. BBN誘発ラット膀胱発がん過程におけるHepatocyte growth factor (HGF)の関与. 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2020年2月)
  - 12) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 慢性腎臓病における再生機構の破綻した尿細管による線維化促進メカニズムの解明. 第2回医薬品毒性機序研究会、川崎 (2020年1月)
  - 13) 梯アンナ、石井直美、奥野高裕、鰐淵英機. NASHモデルTSODマウスにおける肝臓腫瘍および肝臓のメタボローム解析. 第108回日本病理学会総会、東京 (2019年5月)
  - 14) 奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. Acetoaceto-o-toluidideはラット膀胱上皮の細胞増殖を促進し、発がん促進作用を示す. 第108回

- 日本病理学会総会、東京（2019年5月）
- 15) 奥野高裕、魏民、梯アンナ、末水洋志、秦順一、鰐淵英機。アフラトキシンB1はキメラ化したヒト化 TK-NOG マウスのヒト肝領域を特異的に障害する。第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
  - 16) 小島肇、小川久美子、西川秋佳、若林敬二、鰐淵英機、林真、福島昭治、遠山千春。実験動物を用いた安全性・リスク評価に携わる人材育成の必要性。第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
  - 17) 鰐淵英機、魏民。In vivo 発がん物質短・中期検出法の開発。第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
  - 18) 鈴木周五。発がん研究及びがん予防における動物実験の役割。日本がん予防学会第2回認定制度セミナー、北海道（2019年6月）
  - 19) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、梯アンナ、高橋智、鰐淵英機。Nicotine の膀胱発がん促進効果とその機序。第34回発癌病理研究会、三重（2019年8月）
  - 20) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、山下依子、鰐淵英機、高橋智。ラット尿路上皮に対するコチニンの腫瘍促進効果。第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
  - 21) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、魏民、鰐淵英機。非アルコール性脂肪肝炎の肝臓癌におけるアルギニン及び糖代謝産物の蓄積。第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
  - 22) 鰐淵英機、魏民。芳香族アミンによる職業性膀胱がんに関する最新知見。第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
  - 23) 魏民、藤岡正喜、大石裕司、鈴木周五、梯アンナ、山口貴嗣、鰐淵英機。ジフェニルアルシンの胎仔期ばく露におけるマウス肝発がん性の検討。第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
  - 24) 行松直、奥野高裕、魏民、梯アンナ、鰐淵英機。ラットにおけるBBN誘発膀胱発がんに対するアセトアセト- $\alpha$ -トルイジドの促進効果。第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
  - 25) 魏民、鰐淵英機。機能性食品の安全性評価。日本食品化学学会第35回食品化学シンポジウム、東京都（2019年11月）
  - 26) Hideki Wanibuchi。Japanese Society of Toxicologic Pathology: Current Status and Future Prospects。第3回中国薬学会毒性病理専門学術検討会、中華人民共和国（2019年11月）
  - 27) Min Gi。Novel in vivo Bioassays for Prediction of Chemical Carcinogenicity。第3回中国薬学会毒性病理専門学術検討会、中華人民共和国（2019年11月）
  - 28) 鰐淵英機、魏民、梯アンナ、鈴木周五。ジフェニルアルシンの長期毒性及びその発現機序—動物試験から得られた知見—。第23回ヒ素シンポジウム、群馬県、（2019年11月）
  - 29) 豊田武士、山田貴宣、小川久美子。オルト-トルイジン類似構造を有する芳香族アミンによるラット膀胱粘膜傷害および $\gamma$ -H2AX形成。第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
  - 30) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、曹永晩、赤木純一、森川朋美、水田保子、西川秋佳、小川久美子。 $\gamma$ -H2AXを指標とした膀胱発がん物質早期検出法。第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
  - 31) 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：DNA付加体を形成する膀胱発がん性芳香族アミン *o*-toluidine 代謝物の分析、ACEM/JEMS 2019、東京（2019年11月）
  - 32) 降旗千恵、尤馨悦、豊田武士、小川久美子、鈴木孝昌。肝がん原物質2-アセチルアミノフルオレンと $\beta$ -クレシジンの遺伝毒性をFFPE-RNA-Seqで評価。ACEM/JEMS 2019、東京（2019年11月）
  - 33) 田島悠也、豊田武士、平山裕一郎、橋詰力、松下幸平、小川久美子、渡辺賢二、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之。膀胱発がん性芳香族アミン *o*-toluidine のDNA付加体および代謝物分析。第8回食品薬学シンポジウム、静岡（2019年10月）
  - 34) 山田貴宣、豊田武士、小川久美子。ラット膀胱発がん過程における $\gamma$ -H2AX及び膀胱がん幹細胞マーカー陽性細胞の役割。第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
  - 35) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、横井雅幸、花岡文雄、小川久美子。ベンゾ[a]ピレンおよび $\alpha$ -ナフトフラボン併用投与による腫瘍形成におけるPol  $\kappa$ 欠損の影響。第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
  - 36) Ogawa K, Cho YM, Ide T, Akagi J, Toyoda T, Yamashita S, Hirata T. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles. Global Summit on Regulatory Science 2019, Ispra (2019.9)
  - 37) 曹永晩、水田保子、赤木純一、豊田武士、井手鉄哉、小川久美子。腹腔内投与銀ナノ粒子によるBALB/cマウスの急性毒性におけるN-acetyl-l-cysteineの影響。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、東京（2019年9月）
  - 38) 曹永晩、水田保子、赤木純一、井手鉄哉、豊田武士、山下修司、平田岳史、小川久美子。腹腔内投与銀ナノ粒子によるBALB/cマウスの急性毒性に関する検討。第34回発癌病理研究会、鳥羽（2019年8月）
  - 39) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Yamada T, Ogawa K. The toxicological profiles of 1,3-dichloro-2-propanol determined by a repeated-dose 28-day oral toxicity study in F344 rats. IUTOX 15th International Congress of Toxicology, Honolulu (2019.7)
  - 40) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Ide T, Toyoda T, Ogawa K. Effects of antioxidant and inhibitor of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase on acute

toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. IUTOX 15th International Congress of Toxicology, Honolulu (2019.7)

- 41) 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癌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総会、札幌（2019年6月）
- 42) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子。腎臓の再生尿細管及び線維化病変内の尿細管におけるSurvivin、SOX9及びCD44の発現。第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
- 43) 井手鉄哉、山下修司、平田岳史、水田保子、赤木純一、豊田武士、曹永晩、小川久美子。レーザープラズマ質量分析計を用いたナノ粒子イメージングによる銀ナノ粒子の粒径依存的な肝毒性メカニズム検証の試み。第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
- 44) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子。BBN誘発ラット膀胱癌がん過程におけるγ-H2AX形成及び膀胱がん幹細胞マーカー発現の経時的变化。第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
- 45) 森川朋美、豊田武士、松下幸平、山田貴宣、小川久美子。ラットを用いた2-(I-メントキシ)エタノールの90日間亜慢性反復経口投与毒性試験。日本食品化学学会第25回総会・学術大会、松本（2019年6月）
- 46) 野村幸世、豊田武士。MEK阻害剤Selumetinibによる*H. pylori*感染スナネズミ胃粘膜の化生粘膜の回復。第97回日本消化器内視鏡学会総会、東京（2019年6月）
- 47) Nomura S, Toyoda T, Ishibashi Y, Ohmoto Y, Ohtsu H, Yasuda T, Seto Y, Goldenring JR. Evaluation of serum TFF3 levels in gastric cancer patients long after gastrectomy and the origin of high serum TFF3 in gastric cancer animal models. Digestive Disease Week 2019, San Diego (2019.5)
- 48) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、山下依子、高橋智。ラット膀胱癌がんに対するコチニンの影響、第108回日本病理学会総会、東京（2019年5月）
- 49) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智。ラット尿路上皮に対するコチニンの増殖性病変促進効果、第36回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京（2019年2月）
- 50) Totsuka Y, Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS 東京（2019年11月）

- 51) 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））
- 52) 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））
- 53) 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）
- 54) 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 石家庄（2019年7月）
- 55) Totsuka Y, How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting リヨン（2019年7月）
- 56) 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）
- 57) 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）
- 58) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、シンポジウム 毒性病理学会からのトピックス：新しい評価法への挑戦 「人工知能を使ったヒト肺癌細胞像の自動分類」。第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
- 59) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、深層学習によるヒト肺癌細胞像自動分類：アーキテクチャーの違いと分類精度の比較、第60回日本臨床細胞学会総会（春期大会）、東京（2019年6月）

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

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

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

研究分担者 豊田武士 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

## 研究要旨

本研究は、DNA 損傷関連因子である  $\gamma$ -H2AX を病理組織学的マーカーとして用いた、短期膀胱発がんリスク評価法の確立を目的とする。我々は前年度に、化学物質の膀胱発がん性早期検出を目的とした「膀胱における  $\gamma$ -H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与毒性試験に対する既存の OECD テストガイドラインに、オプションとして追加する改定案を提出した。令和元年度は、6 週齢の雄 F344 ラットに新規の被験物質として遺伝毒性または非遺伝毒性の非発がん物質 5 種を 28 日間経口投与し、膀胱粘膜における  $\gamma$ -H2AX 形成を検索することで、本解析手法の感度・特異度について検証を行った。また、遺伝毒性（BBN）および非遺伝毒性膀胱発がん物質（メラミン）を用いて、膀胱粘膜における  $\gamma$ -H2AX 形成の用量相関性を検討した。その結果、非発がん物質 5 種はいずれも  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の増加を誘導しないこと、膀胱発がん物質による  $\gamma$ -H2AX 形成は明瞭な用量相関性を示すことが明らかとなった。これまでに蓄積されたデータを総合すると、ラット膀胱に対する化学物質の発がん性検出における、 $\gamma$ -H2AX 免疫染色の感度・特異度はそれぞれ 82.9% (29/35)・100% (30/30) と、高い精度で予測できることが示された。

## A．研究目的

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

令和元年度は、新規化学物質 5 種についてラット 28 日間反復経口投与試験を実施し、 $\gamma$ -H2AX の膀胱発がん性早期検出指標としての有用性を検証した。また、遺伝毒性・非遺伝毒性膀胱発がん物質をそれぞれ複数の用量でラットに投与し、膀胱における  $\gamma$ -H2AX 形成の用量相関性を併せて検証した。

## B．研究方法

新規被験物質として、遺伝毒性非発がん物質 3 種：2,6-Diaminotoluene (2,6-DAT), 6-Mercaptopurine monohydrate (6-MP), 5-Fluorouracil (5-FU) および非遺伝毒性非発がん物質 2 種：Ethionamide (ETP), Ampicillin trihydrate (AMP) を、6 週齢の雄 F344 ラットに 4 週間経口投与した。各物質の投与濃度は短期試験における最大耐量として、0.1% 2,6-DAT 混餌、0.01% 6-MP 混餌、0.0125% 5-FU 飲水、0.3% ETP 混餌、1000 mg/kg/day AMP 強制経口(溶媒: コーン油)に設定した。

用量相関性の検討として、6 週齢の雄 F344 ラットに遺伝毒性膀胱発がん物質である *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) または非遺伝毒性膀胱

発がん物質であるメラミンを、それぞれ 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.02, 0.05% (飲水) および 0, 0.3, 1, 3% (混餌) の用量で 2 日または 4 週間投与した。

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

(倫理面への配慮)

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

## C．研究結果

新規被験物質について、膀胱粘膜上皮細胞における  $\gamma$ -H2AX 形成を免疫組織化学的に検索した。粘膜上皮細胞 1000 個あたりの  $\gamma$ -H2AX 陽性率を算出した結果、いずれの被験物質も  $\gamma$ -H2AX 陽性率の有意な増加を誘導しないことが示された(図 1)。

BBN およびメラミンの複数用量による検討では、投与開始後 2 日の時点では、いずれの投与群にも病理所見は認められなかった。4 週時点では、BBN の 0.01% 以上投与群およびメラミンの 3% 投与群で、過形成等の病理組織学的変化が認められた。BBN 投与群では 2 日・4 週いずれの時点でも、膀胱粘膜上皮における  $\gamma$ -H2AX・Ki67 陽性率はそれぞれ 0.001% 以上・0.01% 以上の投与群で用量相関性を伴って有意に増加した(図 2, 3)。メラミン投与群では、 $\gamma$ -H2AX・Ki67 陽性率は 2 日・4 週時点でもともに最高用量の 3% 群でのみ有意に増加した

(図4, 5) メラミン投与群(0.3%以上)におけるKi67発現は、2日目の時点で一過性の有意な増加を示した。

-H2AX および Ki67 の多重免疫蛍光染色を実施した結果、メラミン投与群では -H2AX 陽性細胞の大半が Ki67 発現細胞と一致していた一方、BBN 投与群では共発現細胞のみならず、 -H2AX 単独陽性細胞も多く認められた(図6)。

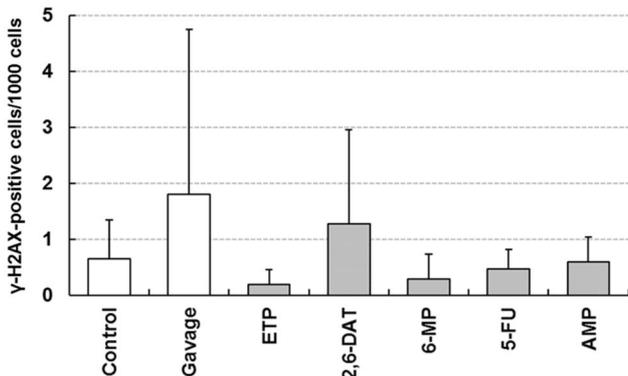


図1. 新規被験物質を投与したラット膀胱粘膜上皮細胞における -H2AX 陽性率。(Student *t*-test).

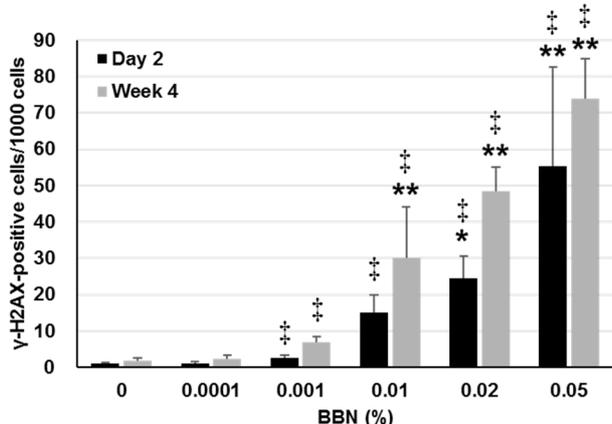


図2. BBN 投与ラット膀胱粘膜上皮における -H2AX 陽性率。\*;  $P < 0.01$  (Dunnett 多群検定), †;  $P < 0.01$  (Jonckheere 傾向検定)。

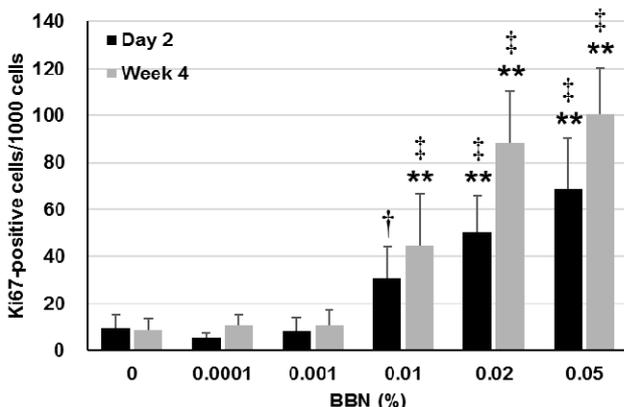


図3. BBN 投与ラット膀胱粘膜上皮における Ki67 陽性率。\*;  $P < 0.01$  (Dunnett 多群検定), †; ‡;  $P < 0.05, 0.01$  (Jonckheere 傾向検定)。

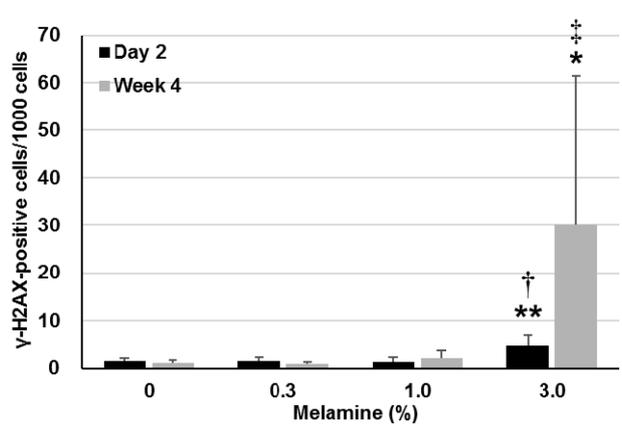


図4. メラミン投与ラット膀胱粘膜上皮における -H2AX 陽性率。\*, \*\*;  $P < 0.05, 0.01$  (Dunnett 多群検定), †, ‡;  $P < 0.05, 0.01$  (Jonckheere 傾向検定)。

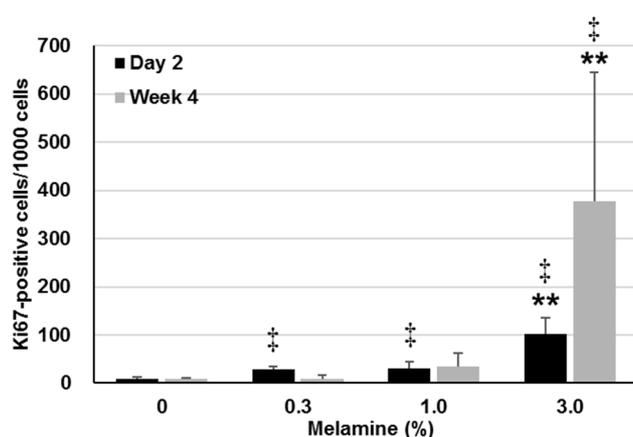


図5. メラミン投与ラット膀胱粘膜上皮における Ki67 陽性率。\*;  $P < 0.01$  (Dunnett 多群検定), †; ‡;  $P < 0.01$  (Jonckheere 傾向検定)。

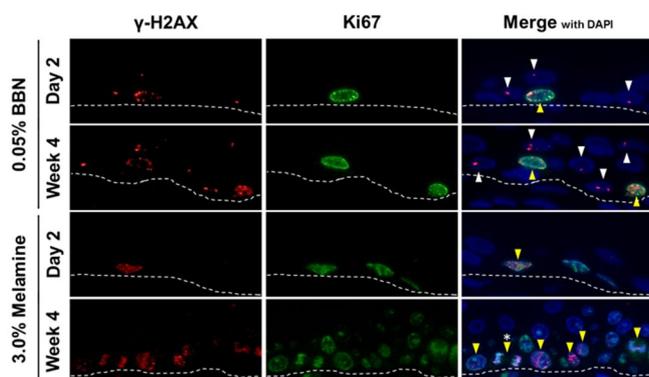


図6. BBN およびメラミン投与ラット膀胱粘膜における -H2AX/Ki67 免疫蛍光染色。 -H2AX 単独陽性細胞(白矢頭)、 -H2AX/Ki67 共発現細胞(黄矢頭)。

#### D. 考察

我々は前年度に、「膀胱における -H2AX 免疫染色」を、28日間反復経口投与と毒性試験に対する既存の OECD テストガイドライン(TG 407)にオプションとして追加する改定案を提出し、OECD 加盟国・機関から多くのレビューコメントを頂いた。令和元年度はこれらの指摘のうち、非発がん物質の評価が不足していること、および -H2AX 形成の用量相関性が未検証であることへ

の対応を実施した。

今年度に新たに検討した 5 種の非発がん物質は、いずれも膀胱粘膜における -H2AX 形成を誘導しなかった。これまでに検討したデータと併せ、-H2AX 免疫染色によって化学物質のラット膀胱に対する発がん性を、感度 82.9% (29/35) および特異度 100% (30/30) と、高い精度で予測できることが示された。

また、遺伝毒性および非遺伝毒性膀胱発がん物質の代表として、それぞれ BBN およびメラミンを用いて、-H2AX 形成の用量相関性を検証した。その結果、膀胱における -H2AX 形成は明瞭な用量相関性を示すことが確認された。

BBN 投与群の膀胱における -H2AX 形成の有意な増加は、過形成等の病理組織学的所見および Ki67 発現増加が生じる用量 (0.01%) よりも低い用量 (0.001%) から認められ、-H2AX がより鋭敏な指標であることが明らかとなった。また、BBN・メラミン投与群における -H2AX 陽性細胞は、いずれも投与開始後 2 日目の時点で有意な増加を示しており、より短期間の試験にも応用できる可能性が示唆された。一方で、いずれの投与群においても、4 週時点での -H2AX 陽性率が 2 日目よりも高いことから、28 日間投与試験への組み込みが適していると考えられる。

多重免疫蛍光染色を用いた解析では、-H2AX・Ki67 陽性細胞の局在パターンが、BBN・メラミン投与群では互いに異なることが明らかとなった。遺伝毒性発がん物質である BBN の投与群には -H2AX 単独陽性細胞が多数認められ、直接的な DNA 損傷が生じていることが示唆された。一方、メラミンは膀胱結石による物理的刺激を介して、尿路上皮細胞の増殖活性を高めることが知られている。メラミン投与群における -H2AX 形成の大半が Ki67 陽性細胞に生じている事実は、細胞増殖活性の増加に伴う複製エラー等、二次的な DNA 損傷の関与を示唆すると考えられる。以上の結果から、膀胱発がん過程における遺伝毒性機序の関与の有無を、病理組織標本上で評価し得る可能性が示された。

## E. 結論

本研究の結果から、-H2AX 免疫染色は、化学物質の膀胱発がん性早期検出法として有用であることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Dose dependency of -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with genotoxic and nongenotoxic bladder carcinogens. J Appl Toxicol. in press.
- 2) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Comprehensive expression analysis of mRNA and microRNA for investigation of compensatory mechanisms in the rat kidney after unilateral nephrectomy. J Appl Toxicol. in press.
- 3) Furihata C, You X, Toyoda T, Ogawa K, Suzuki

T. Using FFPE RNA-Seq with 12 marker genes to evaluate genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens. Genes Environ. 2020; 42: 15.

- 4) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of vanillin propylene glycol acetal in F344 rats. Food Chem Toxicol. 2019; 132: 110643.
2. 学会発表
  - 1) 豊田武士、山田貴宣、井手鉄哉、松下幸平、森川朋美、小川久美子 . F344 ラットの膀胱に認められた神経筋血管過誤腫の一例 . 第 7 回日本獣医病理学専門家協会学術集会、宮崎 (2020 年 3 月)
  - 2) Toyoda T, Yamada T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Mucosal damage and -H2AX formation in the rat urinary bladder induced by aromatic amines with structures similar to that of o-toluidine. 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Anaheim (2020 年 3 月)
  - 3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤木純一、曹永晩、森川朋美、小川久美子 . 腎発がん物質早期検出指標としての -H2AX の応用可能性: 至適評価時点の検討 . 第 36 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2020 年 2 月)
  - 4) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、小川久美子 . 病理学的手法による膀胱発がん性の早期検出および機序解明 . 第 2 回医薬品毒性機序研究会、川崎 (2020 年 1 月)
  - 5) 豊田武士、山田貴宣、小川久美子 . オルト-トルイジン類似構造を有する芳香族アミンによるラット膀胱粘膜傷害および -H2AX 形成 . 第 78 回日本毒学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
  - 6) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、曹永晩、赤木純一、森川朋美、水田保子、西川秋佳、小川久美子 . -H2AX を指標とした膀胱発がん物質早期検出法 . 第 46 回日本毒性学会学術年会、徳島 (2019 年 6 月)
  - 7) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Dose- and time-dependent formation of -H2AX, a biomarker for early detection of bladder carcinogens, and its potential role in tumorigenesis in the rat urinary bladder. 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Anaheim (2020 年 3 月)
  - 8) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、井手鉄哉、西川秋佳、小川久美子 . 肝発がん物質投与ラット肝臓における -H2AX 陽性細胞率の検討 . 第 36 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2020 年 2 月)
  - 9) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子 . 急性腎障害から慢性腎臓病への進展を早期に予測する新規評価分子の探索 . 第 36 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2020 年 2 月)
  - 10) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子 . BBN 誘発ラット膀胱発がん過程における Hepatocyte growth factor (HGF) の関与 . 第 36 回

日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2020年2月）

- 11) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子．慢性腎臓病における再生機構の破綻した尿細管による線維化促進メカニズムの解明．第2回医薬品毒性機序研究会、川崎（2020年1月）
- 12) 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：DNA付加体を形成する膀胱発がん性芳香族アミン *o*-toluidine 代謝物の分析、ACEM/JEMS 2019、東京（2019年11月）
- 13) 降旗千恵、尤馨悦、豊田武士、小川久美子、鈴木孝昌．肝がん原物質 2-アセチルアミノフルオレンと *p*-クレシジンの遺伝毒性を FFPE-RNA-Seq で評価．ACEM/JEMS 2019、東京（2019年11月）
- 14) 田島悠也、豊田武士、平山裕一郎、橋詰力、松下幸平、小川久美子、渡辺賢二、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之．膀胱発がん性芳香族アミン *o*-toluidine の DNA 付加体および代謝物分析．第8回食品薬学シンポジウム、静岡（2019年10月）
- 15) 山田貴宣、豊田武士、小川久美子．ラット膀胱発がん過程における  $\gamma$ -H2AX 及び膀胱がん幹細胞マーカー陽性細胞の役割．第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
- 16) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、横井雅幸、花岡文雄、小川久美子．ベンゾ[a]ピレンおよび  $\beta$ -ナフトフラボン併用投与による腫瘍形成における Pol  $\delta$  欠損の影響．第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
- 17) Ogawa K, Cho YM, Ide T, Akagi J, Toyoda T, Yamashita S, Hirata T. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles. Global Summit on Regulatory Science 2019, Ispra (2019年9月)
- 18) 曹永晩、水田保子、赤木純一、豊田武士、井手鉄哉、小川久美子．腹腔内投与銀ナノ粒子による BALB/c マウスの急性毒性における N-acetyl-L-cysteine の影響．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、東京（2019年9月）
- 19) 曹永晩、水田保子、赤木純一、井手鉄哉、豊田武士、山下修司、平田岳史、小川久美子．腹腔内投与銀ナノ粒子による BALB/c マウスの急性毒性に関する検討 第34回発癌病理研究会、鳥羽（2019年8月）
- 20) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Yamada T, Ogawa K. The toxicological profiles of 1,3-dichloro-2-propanol determined by a repeated-dose 28-day oral toxicity study in F344 rats. IUTOX 15th International Congress of Toxicology, Honolulu (2019年7月)
- 21) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Ide T, Toyoda T, Ogawa K. Effects of antioxidant and inhibitor

of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. IUTOX 15th International Congress of Toxicology, Honolulu (2019年7月)

- 22) 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総会、札幌（2019年6月）
- 23) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子．腎臓の再生尿細管及び線維化病変内の尿細管における Survivin、SOX9 及び CD44 の発現．第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
- 24) 井手鉄哉、山下修司、平田岳史、水田保子、赤木純一、豊田武士、曹永晩、小川久美子．レーザープラズマ質量分析計を用いたナノ粒子イメージングによる銀ナノ粒子の粒径依存的な肝毒性メカニズム検証の試み．第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
- 25) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子．BBN 誘発ラット膀胱発がん過程における  $\gamma$ -H2AX 形成及び膀胱がん幹細胞マーカー発現の経時的变化．第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
- 26) 森川朋美、豊田武士、松下幸平、山田貴宣、小川久美子．ラットを用いた 2-(1-メントキシ)エタノールの 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験．日本食品化学学会第25回総会・学術大会、松本（2019年6月）
- 27) 野村幸世、豊田武士．MEK 阻害剤 Selumetinib による *H. pylori* 感染スナネズミ胃粘膜の化生粘膜の回復．第97回日本消化器内視鏡学会総会、東京（2019年6月）
- 28) Nomura S, Toyoda T, Ishibashi Y, Ohmoto Y, Ohtsu H, Yasuda T, Seto Y, Goldenring JR. Evaluation of serum TFF3 levels in gastric cancer patients long after gastrectomy and the origin of high serum TFF3 in gastric cancer animal models. Digestive Disease Week 2019, San Diego (2019年5月)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

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

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

研究分担者 鈴木 周五 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 准教授

### 研究要旨

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

### A．研究目的

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

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

令和元年度は、この検出法の検出精度を詳細に検討する目的で、膀胱発がん物質での検討とともに、遺伝毒性を有する非発がん物質や有さない非発がん物質を用いて、化学物質に対する特異性について検討した。

### B．研究方法

6週齢F344雄ラットに、16 mg/kg Pioglitazone (PGZ)、50 mg/kg Rosiglitazone (RGZ)、90 mg/kg 1-Nitropropane (1-NP)を強制胃内投与し、173 ppm Sodium arsenite (NaAsO<sub>2</sub>)、0.3% 8-Hydroxyquinoline (8HQ)を混餌投与した。4週間後に屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。肝臓を分担研究者に要望された状態（凍結）で送付した。また、6週齢F344雄ラットに、膀胱発がん促進物質であるcotinineを13、40、120 ppm

で飲水投与し、4週間後に屠殺・剖検し、膀胱を採取した。全ての膀胱組織について免疫組織染色を行い、H2AXおよびKi67の標識率を検討した。

（倫理面への配慮）

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

### C．研究結果

試験開始3日後に90 mg/kg 1-NP投与群が体重減少を来したため、以降は45 mg/kgに濃度変更を行った。試験期間中、1-NP投与群において対照群に比べ、体重増加抑制傾向を認め、屠殺・剖検時の体重は、1-NP投与群で有意に抑制された。

膀胱組織学的検討の結果、NaAsO<sub>2</sub>群で、軽度肥厚傾向を認めたものの、simple hyperplasiaと診断する所見は見られなかった。

膀胱粘膜上皮におけるH2AX標識率は、NaAsO<sub>2</sub>投与群で強い上昇を認め、多群間比較検定でも有意な上昇を示した。一方、各化学物質と対照群との一対一での比較を行った結果、上記のNaAsO<sub>2</sub>において標識率の有意な上昇と、8HQの有意な低下を認めた。他の群では対照群と差がなかった(図1)。

膀胱粘膜上皮におけるKi67標識率は、NaAsO<sub>2</sub>投与群で強い上昇を認め、多群間比較検定でも有意な上昇を示した。一方、各化学物質と対照群との一対一での比較を行った結果、上記のNaAsO<sub>2</sub>および8HQにおいて有意な標識率の上昇を認めた。他群では対照群と差がなかった(図2)。

Cotinine投与群において、H2AX標識率は、濃度依存性にいずれの濃度においても対照群と比較し有意な上昇を認めた。一方、Ki67標識率は、40 ppm以上の投与群で対照群と比較し有意な上昇を認めた(図3)。

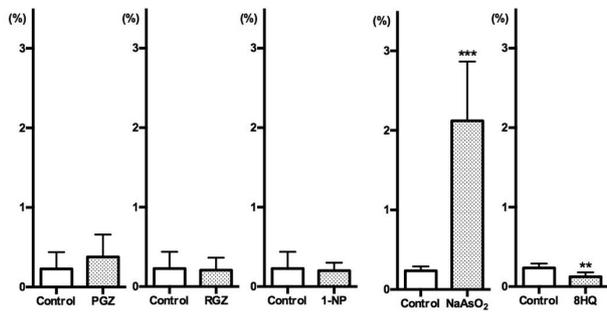


図1. 膀胱粘膜上皮細胞における H2AX陽性細胞の定量解析

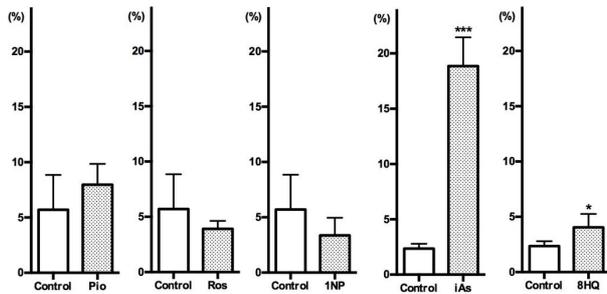


図2. 膀胱粘膜上皮細胞におけるKi67陽性細胞の定量解析

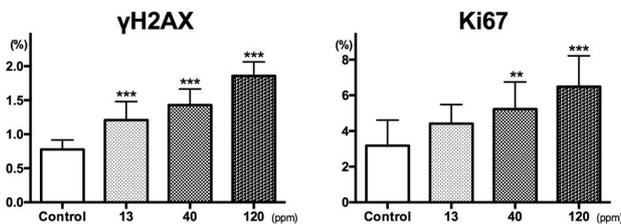


図3. Cotinine投与ラットの膀胱粘膜上皮細胞におけるH2AXおよびKi67陽性細胞の定量解析

#### D. 考察

化審法で実施される28日間反復投与試験においては、各化学物質を対照群と比較検討すると考えるため、今回の膀胱発がん物質検出法を検討するにあたり、各化学物質と対照群との一対一での比較が重要と考えている。結果として、膀胱発がん物質NaAsO<sub>2</sub>および発がん促進物質cotinineについては、検出可能だった。一方、PGZについては、組織学的に膀胱粘膜上皮の肥厚は比較的目的たず、過形成病変を認めなかった。結石による増殖性病変形成が今回の実験条件では乏しかったため、H2AXやKi67標識率の陽性率上昇が乏しかったと推察する。一方で、膀胱発がん性を認めない化学物質3つは、H2AX標識率はいずれも有意な上昇を示さず、H2AXの膀胱発がん性に対する特異性を確認出来た。

#### E. 結論

化審法で実施される28日間反復投与試験において摘出した膀胱を用いたH2AX免疫染色による標識率の検討は、膀胱に特異的な発がん物質の検出法として有用であることを示した。

#### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Etani T, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki T, Iida K, Nozaki S, Kato H, Nagayasu Y, Suzuki S, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. NCL1, A Highly Selective Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apoptosis and Autophagy. *J Clin Med.* 2019; 8.
- 2) Kobayashi M, Inaguma S, Raffeld M, Kato H, Suzuki S, Wakasugi T, Mitsui A, Kuwabara Y, Lasota J, Ikeda H, Miettinen M, Takahashi S. Epithelioid variant of gastrointestinal stromal tumor harboring PDGFRA mutation and MLH1 gene alteration: A case report. *Pathol Int.* 2019; 69: 541-6.
- 3) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Cyclohexanone curcumin analogs inhibit the progression of castration-resistant prostate cancer in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* 2019; 110: 596-607.
- 4) Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Takase H, Hirose A, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. *Cancer Sci.* 2019; 110: 2485-92.
- 5) Okabe A, Kiriya Y, Suzuki S, Sakurai K, Teramoto A, Kato H, Naiki-Ito A, Tahara S, Takahashi S, Kuroda M, Sugioka A, Tsukamoto T. Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker gamma-H2AX. *J Toxicol Pathol.* 2019; 32: 91-9.
- 6) Suzuki S, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Akagi JI, Cho YM, Ogawa K, Takahashi S. Dimethylarsinic acid may promote prostate carcinogenesis in rats. *J Toxicol Pathol.* 2019; 32: 73-7.
- 7) Yukimatsu N, Gi M, Okuno T, Fujioka M, Suzuki S, Kakehashi A, Yanagiba Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, Wanibuchi H. Promotion effects of acetoaceto-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Arch Toxicol.* 2019; 93: 3617-31.
- 8) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. *Toxicology.* 2019: in press.

#### 2. 学会発表

- 1) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、山下依子、高橋智ラット膀胱発がんに対するコチニンの影響、第 108 回日本病理学会総会、東京 (2019 年 5 月)
- 2) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、山下依子、鰐淵英機、高橋智、ラット尿路上皮に対するコチニンの腫瘍促進効果、第 78 回日本癌学会学術総会、大阪 (2019 年 9 月)
- 3) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智、ラット尿路上皮に対するコチニンの増殖性病変促進効果、第 36 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京 (2019 年 2 月)

**G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)**

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

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

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

研究代表者 鰐淵英機 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 教授

### 研究要旨

本研究は化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化を可能とする評価モデルの構築を目的とし、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの開発および検証を行った。遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質 60 物質についてラット単回投与を行い、投与 24 時間後の肝臓におけるマーカー遺伝子（10 遺伝子）の発現データを qPCR で取得し、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いて肝発がん性を予測した。これまで 23 の遺伝毒性肝発がん物質を検討したが、今回はそのうち偽陰性となった 6 物質について投与用量を上げて検討した。その結果、6 物質のうち 2 物質が陽性となった。これまでに取得した 60 物質のデータを総合すると、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度 82.6%(19/23)及び特異度 97.3%(36/37)と、高い精度で検出できる可能性が示唆された。

### A．研究目的

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

令和元年度は、前年度までに解析した遺伝毒性肝発がん物質 23 種のうち、偽陰性となった 6 種の物質について、投与用量を上げてラット単回投与試験を行い、得られた遺伝子発現データを予測モデルに入力し、判定を行った。

### B．研究方法

偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質 6 種（表 1）

(Benzidine (BZ), Hydrazine (HZ), 4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA), Dichloroacetic acid (DCA), Vinyl bromide (VB), Hydrazine sulfate (HS))について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。投与用量（各物質の LD50 の 1/2 および 1/3）を用いた。動物試験および遺伝子解析は 3 施設（香川大・藤田医科大・大阪市立大）で行われた。

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

表 1 令和元年度に検討した遺伝毒性肝発がん物質

被検物質	TD50	投与量		判定結果	正否
	(mg/kg/day)	(mg/kg)	Dose/LD50		
Benzidine (BZ)	1.73	150	1/2	Negative	×
		210	2/3	Negative	×
Hydrazine (HZ)	0.613	30	1/2	Negative	×
		40	2/3	Negative	×
4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)	9.51	360	1/2	Negative	×
		480	2/3	Negative	×
Vinyl bromide (VB)	18.5	250	1/2	Negative	×
		330	2/3	Negative	×
Dichloroacetic acid (DCA)	161	1410	1/2	Negative	×
		1880	2/3	Positive	○
Hydrazine sulfate (HS)	40.8	300	1/2	Positive	○
		400	2/3	Positive	○

（倫理面への配慮）

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

### C．研究結果

各施設で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝

毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った(表 1)。本モデルでは、遺伝毒性肝発がん物質を「陽性」、その他の物質を「陰性」と判定する。偽陰性であった 6 物質のうち、HS については、LD50 の 1/2 および 2/3 投与量で、DCA については LD50 の 2/3 投与量で、陽性となった。

結果、60 物質での結果は、感度 82.6%(19/23)、特異度 97.3%(36/37)となった。

#### D . 考察

遺伝毒性肝発がん物質検出モデルの検証では、偽陰性となった 6 物質のうち、HS が LD50 の 1/2 および 2/3 投与時に、DCA が LD50 の 2/3 投与時に陽性と判定された。これまでに取得した 60 物質に対して、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度 82.6%(19/23)および特異度 97.3% (36/37)と、高い精度で検出できる可能性が示唆された。

#### E . 結論

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

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H: Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. Arch Toxicol. 2020; 94: 927-37.
- 2) Yukimatsu N, Gi M, Okuno T, Fujioka M, Suzuki S, Kakehashi A, Yanagiba Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, Wanibuchi H. Promotion effects of acetoaceto-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. Arch Toxicol. 2019; 93: 3617-3631.
- 3) Yoshida K, Gi M, Fujioka M, Teramoto I, Wanibuchi H. Long-term administration of excess zinc impairs learning and memory in aged mice. J Toxicol Sci. 2019; 44: 681-691.
- 4) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Tago Y, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in the drinking water of C57BL/6J mice for 52 weeks. J Toxicol Pathol. 2019; 32: 127-134.
- 5) Takakuwa T, Okuno T, Nishimoto M, Nanno S, Takeoka Y, Nakashima Y, Koh H, Nakane T, Wanibuchi H, Hino M, Nakamae H. [Refractory ascites caused by lymphatic flow disorder after stem cell transplantation for acute myeloid leukemia]. Rinsho Ketsueki. 2019; 60: 12-16.

- 6) Osawa T, Shimamura T, Saito K, Hasegawa Y, Ishii N, Nishida M, Ando R, Kondo A, Anwar M, Tsuchida R, Hino S, Sakamoto A, Igarashi K, Saitoh K, Kato K, Endo K, Yamano S, Kanki Y, Matsumura Y, Minami T, Tanaka T, Anai M, Wada Y, Wanibuchi H, Hayashi M, Hamada A, Yoshida M, Yachida S, Nakao M, Sakai J, Aburatani H, Shibuya M, Hanada K, Miyano S, Soga T, Kodama T. Phosphoethanolamine Accumulation Protects Cancer Cells under Glutamine Starvation through Downregulation of PCYT2. Cell Rep. 2019; 29: 89-103 e107.
  - 7) Okuno T, Yashiro M, Masuda G, Togano S, Kuroda K, Miki Y, Hirakawa K, Ohsawa M, Wanibuchi H, Ohira M. Establishment of a New Scirrhous Gastric Cancer Cell Line with FGFR2 Overexpression, OCUM-14. Ann Surg Oncol. 26: 2019; 1093-1102.
  - 8) Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatsu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, Wanibuchi H. Acetoaceto-o-Toluidide Enhances Cellular Proliferative Activity in the Urinary Bladder of Rats. Toxicol Sci. 2019; 169: 456-464.
  - 9) Ohira T, Kojima H, Kuroda Y, Aoki S, Inaoka D, Osaki M, Wanibuchi H, Okada F, Oshimura M, Kugoh H. PITX1 protein interacts with ZCCHC10 to regulate hTERT mRNA transcription. PLoS One. 2019; 14: e0217605.
  - 10) 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.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 魏民、梯アンナ、鈴木周五、梯アンナ、山口貴嗣、鰐淵英機 . ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による肝発がん作用. 第 36 回日本毒性病理学会総会、東京 (2020 年 2 月)
  - 2) 梯アンナ、石井直美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機 . NASH 肝臓発がんにおける新規マーカー候補分子の同定. 第 36 回日本毒性病理学会総会、東京 (2020 年 2 月)
  - 3) 行松直、魏民、梯アンナ、鈴木周五、鰐淵英機 . ラットにおける BBN 誘発膀胱発がんに対する o-Acetoacetotoluidide の促進効果. 第 36 回日本毒性病理学会総会、東京 (2020 年 2 月)
  - 4) 魏民、鰐淵英機 . 機能性食品の安全性評価 . 日本食品化学学会第 35 回食品化学シンポジウム、東京都 (2019 年 11 月)
  - 5) Hideki Wanibuchi. Japanese Society of Toxicologic Pathology: Current Status and Future Prospects. 第 3 回中国薬学会毒性病理専門学術検討会、中華人民共和国 (2019 年 11 月)

- 6) 鰐淵英機、魏民、梯アンナ、鈴木周五．ジフェニルアルシン酸の長期毒性及びその発現機序 - 動物試験から得られた知見 - .第 23 回ヒ素シンポジウム、群馬県、(2019 年 11 月)
- 7) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、山下依子、鰐淵英機、高橋智．ラット尿路上皮に対するコチニンの腫瘍促進効果．第 78 回日本癌学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
- 8) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、魏民、鰐淵英機．非アルコール性脂肪肝炎の肝臓癌におけるアルギニン及び糖代謝産物の蓄積．第 78 回日本癌学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
- 9) 鰐淵英機、魏民．芳香族アミンによる職業性膀胱がんに関する最新知見．第 78 回日本癌学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
- 10) 魏民、藤岡正喜、大石裕司、鈴木周五、梯アンナ、山口貴嗣、鰐淵英機．ジフェニルアルシン酸の胎仔期ばく露におけるマウス肝発がん性の検討．第 78 回日本癌学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
- 11) 行松直、奥野高裕、魏民、梯アンナ、鰐淵英機．ラットにおける BBN 誘発膀胱発がんに対するアセトアセト-o-トルイジドの促進効果．第 78 回日本癌学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
- 12) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、梯アンナ、高橋智、鰐淵英機．Nicotine の膀胱発がん促進効果とその機序．第 34 回発癌病理研究会、三重(2019 年 8 月)
- 13) 小島肇、小川久美子、西川秋佳、若林敬二、鰐淵英機、林真、福島昭治、遠山千春．実験動物を用いた安全性・リスク評価に携わる人材育成の必要性．第 46 回日本毒性学会学術年会、徳島 (2019 年 6 月)
- 14) 鰐淵英機、魏民．In vivo 発がん物質短・中期検出法の開発．第 46 回日本毒性学会学術年会、徳島 (2019 年 6 月)
- 15) 奥野高裕、魏民、梯アンナ、末水洋志、秦順一、鰐淵英機．アフラトキシン B1 はキメラ化したヒト化 TK-NOG マウスのヒト肝領域を特異的に障害する．第 46 回日本毒性学会学術年会、徳島 (2019 年 6 月)
- 16) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、鰐淵英機．NASH モデル TSOD マウスにおける肝臓腫瘍および肝臓のメタボローム解析．第 108 回日本病理学会総会、東京 (2019 年 5 月)
- 17) 奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機．Acetoaceto-o-toluidide はラット膀胱上皮の細胞増殖を促進し、発がん促進作用を示す．第 108 回日本病理学会総会、東京 (2019 年 5 月)

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

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

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

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 環境リスク評価学 准教授

## 研究要旨

本研究は化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化を可能とする評価モデルの構築を目的とし、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの開発および検証を行った。遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質のラット単回投与を行い、投与 24 時間後の肝臓におけるマーカー遺伝子（10 遺伝子）の発現データを qPCR で取得し、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いて肝発がん性を予測した。本年度はこれまでの検討で偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質の 3 物質について投与用量を上げて検討した。その結果、すべては「陰性」と判定された。この結果から、我々が構築した遺伝子セットを用いた肝発がん性予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を高い特異度で検出できるが、偽陰性になる物質がある。今後も本試験系の検出限界や改良についての検証を引き続き行う必要がある。

## A．研究目的

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

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

平成 29 年度および平成 30 年度の検討の結果、遺伝毒性発がん物質の検出に本モデルの有用性が確認された一方で、偽陰性を示す物質が認められた。令和元年度（平成 31 年度）では、陰性と判定された遺伝毒性肝発がん物質 3 種類について、投与量を上げた再検討を実施した。

## B．研究方法

これまでの検討で陰性と判定された遺伝毒性肝発がん物質である Benzidine (BZ)、Hydrazine (HZ) および 4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA) について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。実験動物は 6 週齢の雄 SD ラットを用いた。投与量はこれまでに検討した LD50 の 1/2 から LD50 の 1/2 および 2/3 に上げた（表 1）。

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

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

得られた遺伝子発現データを我々が構築した遺伝毒

性肝発がん物質検出モデル（サポートベクターマシンによる数数学的アルゴリズムによるモデル）に入力し、陽性または陰性の判定を行った。

（倫理面への配慮）

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

### C. 研究結果

qPCR で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った。本モデルでは、遺伝毒性ラット肝発がん物質を「陽性」、その他の物質（非遺伝毒性ラット肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質）を「陰性」と判定する。その結果、本年度に検討した3物質はすべて「陰性」と判定された(表1)。

表1 令和元年度に検討した遺伝毒性肝発がん物質

被検物質	TD50	投与量		判定結果	正否
	(mg/kg/day)	(mg/kg)	Dose/LD50		
Benzidine (BZ)	1.73	150	1/2	Negative	×
		210	2/3	Negative	×
Hydrazine (HZ)	0.613	30	1/2	Negative	×
		40	2/3	Negative	×
4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)	9.51	360	1/2	Negative	×
		480	2/3	Negative	×

### D. 考察

遺伝毒性肝発がん物質の3物質が偽陰性となった。今後、検出精度を上げるには偽陰性物質について最大耐量を用いて再評価する必要があると考えられる。

### E. 結論

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

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H: Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. Arch Toxicol. 2020; 94: 927-37.
- 2) Yukimatsu N, Gi M, Okuno T, Fujioka M, Suzuki S, Kakehashi A, Yanagiba Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, Wanibuchi H. Promotion effects of acetoaceto-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. Arch Toxicol. 2019; 93: 3617-3631.

- 3) Yoshida K, Gi M, Fujioka M, Teramoto I, Wanibuchi H. Long-term administration of excess zinc impairs learning and memory in aged mice. J Toxicol Sci. 2019; 44: 681-691.
- 4) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Tago Y, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in the drinking water of C57BL/6J mice for 52 weeks. J Toxicol Pathol. 2019; 32: 127-134.
- 5) Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatsu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, Wanibuchi H. Acetoaceto-o-Toluidide Enhances Cellular Proliferative Activity in the Urinary Bladder of Rats. Toxicol Sci. 2019; 169: 456-464.
- 6) 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.

#### 2. 学会発表

- 1) 魏民、梯アンナ、鈴木周五、梯アンナ、山口貴嗣、鰐淵英機 . ジフェニルアルシンのマウス経胎盤ばく露による肝発がん作用. 第36回日本毒性病理学会総会、東京（2020年2月）
- 2) 梯アンナ、石井直美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機 . NASH肝臓発がんにおける新規マーカー候補分子の同定. 第36回日本毒性病理学会総会、東京（2020年2月）
- 3) 行松直、魏民、梯アンナ、鈴木周五、鰐淵英機 . ラットにおけるBBN誘発膀胱発がんに対するo-Acetoacetotoluidideの促進効果. 第36回日本毒性病理学会総会、東京（2020年2月）
- 4) 魏民、鰐淵英機 . 機能性食品の安全性評価 . 日本食品化学学会第35回食品化学シンポジウム、東京都（2019年11月）
- 5) Gi M. Novel *in vivo* Bioassays for Prediction of Chemical Carcinogenicity, The 3th Chinese Pharmaceutical Association-Society of Toxicologic pathology (CPA-STP) Meeting, Shu Zhou, China（2019年11月）
- 6) 鰐淵英機、魏民、梯アンナ、鈴木周五 . ジフェニルアルシンの長期毒性及びその発現機序 - 動物試験から得られた知見 - . 第23回ヒ素シンポジウム、群馬県、（2019年11月）
- 7) 梯アンナ、石井直美、奥野高裕、魏民、鰐淵英機 . 非アルコール性脂肪肝炎の肝臓癌におけるアルギニン及び糖代謝産物の蓄積 . 第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
- 8) 鰐淵英機、魏民 . 芳香族アミンによる職業性膀胱がんに関する最新知見 . 第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
- 9) 魏民、藤岡正喜、大石裕司、鈴木周五、梯アンナ、山口貴嗣、鰐淵英機 . ジフェニルアルシンの胎

- 仔期ばく露におけるマウス肝発がん性の検討．第 78 回日本癌学会学術総会、京都（2019 年 9 月）
- 10) 行松直、奥野高裕、魏民、梯アンナ、鰐淵英機．ラットにおける BBN 誘発膀胱発がんに対するアセトアセト-o-トルイジドの促進効果．第 78 回日本癌学会学術総会、京都（2019 年 9 月）
  - 11) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、梯アンナ、高橋智、鰐淵英機．Nicotine の膀胱発がん促進効果とその機序．第 34 回発癌病理研究会、三重（2019 年 8 月）
  - 12) 鰐淵英機、魏民．In vivo 発がん物質短・中期検出法の開発．第 46 回日本毒性学会学術年会、徳島（2019 年 6 月）
  - 13) 奥野高裕、魏民、梯アンナ、末水洋志、秦順一、鰐淵英機．アフラトキシン B1 はキメラ化したヒト

- 化 TK-NOG マウスのヒト肝領域を特異的に障害する．第 46 回日本毒性学会学術年会、徳島（2019 年 6 月）
- 14) 奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機．Acetoaceto-o-toluidide はラット膀胱上皮の細胞増殖を促進し、発がん促進作用を示す．第 108 回日本病理学会総会、東京（2019 年 5 月）

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## 研究要旨

遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力を検証するため検討を行った。多種の遺伝毒性肝発がん物質、非肝発がん物質、及び非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、24時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。その結果、本モデルでは大多数の遺伝毒性肝発がん物質の検出を行うことができると考えられるが、稀に偽陰性となる物質があり、投与濃度等に留意する必要があると考えられた。また、今回は投与24時間後にのみ評価を行ったが、評価時期の再考の必要性も感じられた。また、今回は投与24時間後にのみ評価を行ったが、評価時期の再考の必要性も感じられた。

## A．研究目的

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

当施設ではこれまで開発した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性をより一層検証し、確立することを目的とした。遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力を検証するため検討を行った。多種の遺伝毒性肝発がん物質、非肝発がん物質、及び非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、24時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。本研究の特色は化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に予測できる評価法及びヒトへの外挿に必要な発がんメカニズムに関する情報が得られる試験系を確立することにある。

平成29年度および平成30年度の検討の結果、遺伝毒性肝発がん物質の検出に本モデルの有用性が確認された一方で、擬陽性や偽陰性を示す物質が認められた。令和元年度（平成31年度）では、偽陰性物質についてさらに投与容量の設定を詳細に検証する検討を行った。

## B．研究方法

令和元年度（平成31年度）では、平成29年度および平成30年度で偽陰性となった2物質について当施設において検討を行った。各物質についてラット単回投与試験（剖検は投与24時間後）を行い、得られた肝組織から遺

伝子発現データを取得した。本研究全体における動物試

験は3施設（担当：鰐淵/魏、塚本、横平）で行われた。動物試験プロトコールは事前に共有・配布し、プロトコールに従い試験を実施した。遺伝子発現については、リアルタイムPCRでのデータを取得した。

日本チャールズリバー社（神奈川県厚木）より購入した4週齢のSDラット（雄性）について、2週間の馴化期間の後に実験を開始した。群構成を表1に示す。馴化期間に体重測定を行い、各群の平均体重にばらつきがないよう群分けを行った。実験開始時に、体重測定を行いながら体重当たりの投与量に調整した被験物質を各動物に強制胃内投与した。被験物質の投与濃度はLD50の1/2および2/3とした。被験物質投与後24時間後に剖検を行ったが、剖検は、イソフルラン（abbvie #B506）吸入麻酔後、腹部大動脈から自然放血により安楽死させた。安楽死後、開腹し、臓器に肉眼的異常の有無を観察した。肝臓を摘出し、RNA抽出用として、外側左葉(LL)を摘出後、下端辺縁部を約2cm×0.5cmの大きさで2スライス切り出した。それぞれ1mLのRNAlaterが入った1.5mLチューブへ移した（合計2本、そのうち1本は、他施設でのバリデーション用）。1.5mLチューブを4℃で一晩保管後、-80℃へ長期保管した。凍結保存サンプル用として、RNA抽出用に採材した後の残りの外側左葉の上半分を1.5mLチューブ2本分採取し、液体窒素により凍結後、ディープフリーザーにて凍結保管した（一本はDNA adduct 解析用）。ホルマリン固定用サンプルは、外側左葉の下半分、内側右葉(RM)および右葉尾部(R2)から計3スライス切り出し、カセットにおいて10%ホルマリンにて固定した。

リアルタイムRT-PCRについては施設共通のプロトコールを基に行った。具体的には、肝臓からのtotal RNA抽出はRNeasy mini kit（キアゲン）を使用し、3mm×3mm程度の肝組織片からtotal RNAを抽出した。30μLのRNase free H2Oで溶出した。cDNAの合成はSuper Script IV VIL0 Maste Mix(invitrogen)のキットを使用し、total RNA 1000 ngとした。逆転写反応は、total 20μLのv

olumeで行った。サーマルサイクラーによる反応は、25 : 10min、50 : 10min、85 : 5min、4 : として。

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

リアルタイムRT-PCRの結果について、遺伝子発現データを構築済の肝発がん性予測モデル(サポートベクターマシンによる数理的アルゴリズムによるモデル)に入力し、肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った。

#### (倫理面の配慮)

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

### C . 研究結果

被験物質投与後24時間後に2-Nitrosopropane群の2匹、Ethylene thiourea 1/2群の1匹、Dichloroacetic acid 2/3群の2匹、Dichloroacetic acid 2/3群の2匹の死亡が確認された。Dichloroacetic acid投与群の死亡例は全例に胃穿孔が確認された。

肝発がん性の陽性または陰性の判定の結果を表3に示す。Dichloroacetic acid はLD50の2/3用量で陽性となった一方で、Ethylene thioureaは陰性であった。

### D . 考察

Ethylene thioureaについて、マウスでは肝臓をターゲットとするが、ラットではターゲットとしない報告があり(National Toxicology Program, 2002)、再検証結果の陰性を支持するものである。

今回の実験から、本試験系ではほぼ遺伝毒性肝発癌物質の検出を行うことができるが、稀に偽陰性となる物質があり、投与濃度等に留意する必要があると考えられた。また、今回は投与24時間後にのみ評価を行ったが、評価時期の再考の必要性も感じられた。

### E . 結論

今回、遺伝子セットを用いた判定方法により、ほとんどの遺伝毒性発がん物質が正確に判定されたが、偽陰性例も見られ、今後も本試験系の限界や改良について

の検証を引き続き行う必要があると考えられた。

### F . 研究発表

#### 1 . 論文発表

- 1) Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Hashimoto N, Kanie S, Yoshida S, Imaida K. Characteristics of surfactant proteins in tumorigenic and inflammatory lung lesions in rodents. J Toxicol Pathol. 2018; 31(4): 231-240.
- 2) Yokohira M, Nakano-Narusawa Y, Yamakawa K, Hashimoto N, Yoshida S, Kanie S, Imaida K. Validating the use of napsin A as a marker for identifying tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in rodents. Exp Toxicol Pathol. 2017; 69(8): 637-642.
- 3) Kanie S, Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Yoshida S, Hashimoto N, Imaida K. Suppressing effects of the expectorant drug ambroxol hydrochloride on quartz-induced lung inflammation in F344 rats. J Toxicol Pathol. 2017; 30(2): 153-159.

#### 2 . 学会発表

- 1) 横平政直 . 肺胞サーファクタントの役割と発癌リスク評価への応用 (The Role of Surfactant proteins and the Application for Assessment of the risk of Carcinogenesis) . 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄(2018年1月)
- 2) 横平政直 . 肺過形成性病変の発癌リスク評価における napsin A の発現と予防作用検出の試み、第25回日本がん予防学会総会、高松(2018年6月)

### G. 知的所有権の取得状況

#### 1 . 特許取得

なし

#### 2 . 実用新案登録

なし

#### 3 . その他

なし

表 1 群構成 (令和元年度 (平成 31 年度))

Groups	被験物質	LD50 mg/kg	投与量mg/kg
1	2-Nitrosopropane	720	240
2	Ethylene thiourea 2/3(LD50)	1832	1220
3	Ethylene thiourea 1/2	1832	920
4	Dichloroacetic acid 2/3	2820	1880
5	Dichloroacetic acid 1/2	2820	1410
6	0.5% Methyl cellulose		5ml/kg b.w.

表 2 リアルタイム RT-PCR で用いたプライマー

Gene	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
1385132_at	ggatgtgtgaagtcagttcca	tttctgaagatgccaagca
Aen	ggcctgccctcactataa	agcggtaagaaagctctgga
Atp6v1f	tgaaatcgaagacacttcagg	gctccttgacgggatct
Rage	ccagtcacaactggtcattctc	cagactagtcggcccctgt
Cdkn1a	gatccacagcgatcgcgagac	acatcaccaggatcggacat
Fam49a	cacacttctcctggatttga	aggatgctctcggaatctg
Glx3	ccacagtgtgtacagatgaacg	aacagcttcggcttccag
Nudt5	ggctacaaaggtgacattgct	gcagttgacaagcctggat
Phlda3	accacgaggcataccatttt	caaccaaccaaagtgacag
RGD1308114	atggcctcgttatggagatg	tgctctgacatcttgaacttg

表 3 判定結果 (令和元年度 (平成 31 年度))

Chemicals	Predicted (Carcinogenicity)
2-Nitrosopropane- 2	[Positive]
Ethylene thiourea 2 of 3	[Negative]
Ethylene thiourea 1 of 2	[Negative]
Dichloroacetic acid 2 of 3	[Positive]
Dichloroacetic acid 1 of 2	[Negative]

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

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

研究分担者 塚本徹哉 藤田医科大学医学部病理診断学 教授

## 研究要旨

環境中の様々な化学物質の曝露は発がん要因の1つとして重要であり、その発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は喫緊の課題である。本研究では、遺伝毒性発がん性マーカーセットにより、遺伝毒性肝発がん性を判定できる24時間ラット超短期動物試験系を用い、化学物質の肝発がん性の評価法を検討した。遺伝毒性肝発がん物質（2-Nitropropane）を陽性対照、溶媒の0.5% Methyl cellulose (MC)を陰性対象群とし、昨年度までの検討で、偽陰性となった2種類の遺伝毒性肝発がん物質（Vinyl Bromide、Hydrazinium Sulfate）を低用量あるいは高容量投与した時のラット肝の10遺伝子（1385132\_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114）の転写レベルの発現データを検討し、サポートベクターマシーン（SVM）による肝発がん性予測数理学的モデルを用いて解析した。その結果、Vinyl Bromideは陰性判定となったが、Hydrazinium Sulfateは遺伝毒性肝発がん物質と判定された。判定に変動がある物質や従来との知見と異なる評価となった物質に関しては化学物質特異的な代謝等、今後更なる検討が必要と考えられた。

## A．研究目的

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

## B．研究方法

30匹の6週齢オス Sprague-Dawley (SD)ラットを以下の6群に分け、1週間後に実験に供した。

溶媒の0.5% Methyl cellulose (MC)を陰性対象群とした(G1)。陽性対照として240 mg/kg 体重 (body weight, BW) 2-Nitropropaneを用いた (G6)。

被験化学物質として、H29年度、H30年度の検討で、1385132\_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114の10遺伝子を用いた判定で陽性所見の得られなかった遺伝毒性肝発がん物質2物質について2用量の再検討を試み、以下の4群を設定した：Vinyl Bromide, 250 mg/kg 体重 (G2)、Vinyl Bromide, 330 mg/kg 体重 (G3)、Hydrazinium Sulfate, 300 mg/kg 体重 (G4)、Hydrazinium Sulfate, 400 mg/kg 体重 (G5)。

DIMS 医科学研究所において、以上の群について、6週齢オス Sprague-Dawley (SD)ラット単回強制胃内投与試験（各群5匹）を行い、24時間後に剖検を行い、得られた肝組織の一部を凍結保存した。藤田医科大学にて、肝組織から total RNA を抽出 (RNeasy mini kit, QIAGEN) 後、cDNA を作製 (SuperScript IV VIL0

Mater Mix, ThermoFisher) した。18S rRNA を内部標

準として (Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control, ThermoFisher) 昨年と同様の10遺伝子 (1385132\_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) について、ABI PRISM-7900HTを用いて、標識した Roche Universal Primer を使い、real time RT-PCR 法により遺伝子発現データを取得した。

結果は、対照群を0としたときの Ct 値で表した。その値を、大阪市大で構築済の肝発がん性予測モデル (サポートベクターマシーン (SVM) による数理学的アルゴリズムによるモデル) に入力し、遺伝毒性肝発がん性の評価を行った。

(倫理面の配慮)

動物実験は、動物の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議、2006年) 及び藤田医科大学動物実験取扱規定を遵守した。なお、動物実験は DIMS 医科学研究所に委託し、現地で研修ののち遂行した。

## C．研究結果

陰性対象 (G1) を0とした時の10遺伝子 (1385132\_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) の Ct 値を算出した。Groups: 2, 3, 4, 5, 6 について、それぞれ以下の通りであった。

1385132\_at: -1.18, -0.68, 0.68, 1.89, 3.02

Aen: -0.50, -0.00, 2.35, 3.23, 4.05

Atp6v1f: -0.16, 0.07, 0.78, 1.17, 1.35

Rage: -0.30, -0.10, 0.98, 1.75, 3.79

Cdkn1a : -0.42, -0.05, 3.80, 4.11, 5.04  
Fam49a : -0.19, -0.01, 1.31, 1.54, 1.95  
Glr3 : -0.27, -0.02, 0.83, 1.59, 2.00  
Nudt5 : -0.14, 0.04, 1.08, 1.49, 1.37  
Phlda3 : -0.47, 0.17, 1.30, 1.54, 3.05  
RGD1308114 : -0.46, -0.20, -0.30, -0.81, -4.13

SVMによる解析の結果では、G2-5の被験物質のうち、Vinyl Bromideは陰性となったが、Hydrazinium Sulfateの2群は低用量、高用量において用量依存性がありいずれも陽性と判定された。

#### D. 考察

平成29年度、平成30年度のreal-time PCRを用いた定量PCRで、遺伝毒性肝発がん物質の中に、陰性判定となるものがあったため、施設を替えて再検討を行った。その結果、Hydrazinium Sulfateの2群は低用量、高用量とも陽性と判定され、予想通りの判定結果が得られた。

#### E. 結論

10遺伝子の発現量の変動を解析することにより、24時間という超短期間で、化学物質の遺伝毒性肝発がん性の予測が可能なモデルの構築が可能と判断された。しかし、予測と異なる判定となる物質があること、再評価で判定が異なることがあることなど、さらに詳細な検討が必要と考えられた。また、解析アルゴリズムが2-Nitropropaneによって得られたデータに基づいているため、異なる化学物質の代謝特異性等の評価も不可欠と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Teramoto A, Yamada A, Kiriyama Y, Tsukamoto T, Yan K, Zhang L, Imaizumi K, Saito K, Fujita H. Automated classification of benign and malignant cells from lung cytological images using deep convolutional

neural network. Informatics in Medicine Unlocked 2019; 16: 100205.

- 2) Teramoto A, Tsukamoto T, Yamada A, Kiriyama Y, Imaizumi K, Saito K, Fujita H. Deep learning approach to classification of lung cytological images: Two-step training using actual and synthesized images by progressive growing of generative adversarial networks. PLoS One. 2020; 15: e0229951.
- 3) Cao D, Zhao D, Jia Z, Su T, Zhang Y, Wu Y, Wu M, Tsukamoto T, Oshima M, Jiang J, Cao X. Reactivation of Atp4a concomitant with intragenic DNA demethylation for cancer inhibition in a gastric cancer model. Life Sci. 2020; 242: 117214.

#### 2. 学会発表

- 1) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、シンポジウム 毒性病理学会からのトピックス：新しい評価法への挑戦 「人工知能を使ったヒト肺癌細胞像の自動分類」.第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
- 2) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、深層学習によるヒト肺癌細胞像自動分類：アーキテクチャーの違いと分類精度の比較、第60回日本臨床細胞学会総会（春期大会）東京（2019年6月）

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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

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

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

### 研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、DNA 付加体の網羅的解析手法(DNA アダクトーム法)の構築に取り組んできた。本年度は、肝発がん性検出評価系の再現性確認と施設間バリデーション試験の実施に用いたラット肝臓サンプルを用い、複数の遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価を、アダクトーム法により検討した。遺伝毒性ラット肝発がん物質として、2-Nitropropane (2-NP；陽性対照) *o*-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 4,4'-Thiodianiline (TDA)、N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), Nitrosodibutylamine (NB), N-Nitrosopyrrolidine (NNP), 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (MDA)、遺伝毒性非発がん物質；Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT)、非遺伝毒性肝発がん物質；Monocrotaline (MCT), Phenobarbital (PB)、非遺伝毒性非肝発がん物質；Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI), Indomethacin (IM), Phenylbutazone (PhB), Promethazine (PMZ), Sulindac (SUL), Tetracycline (TC), Ethionamide (ETH), Theophylline (TEO), Caffeine (CAF), Chloramphenicol (CMP)をそれぞれラットに投与し、24 時間後に肝臓に生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。得られたデータを線形判別分析(LDA)により分類したところ、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の 4 つのグループに分離されることがわかった。これらデータの一部を教師データとして用い、機械学習による化学物質の遺伝毒性/発がん性の予測モデルの構築を試みた。試作した遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いて、テストデータに対して予測を行ったところ、93%以上の正解率が得られた。また、Leave-One-Out 交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、わずかに正答率が減少した。現在、アダクトームデータに化学物質構造データを追加し、予測精度の向上について検討中である。また、各グループの予測に重要な付加体の探索を行うと同時に、更に化学物質の数を増やし、予測精度の向上について検討を行う予定である。

### A．研究目的

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

用い、肝臓をターゲットとした複数の遺伝毒性/非遺伝

毒性非発がん物質の肝臓における DNA 損傷を LC-MS を用いたアダクトーム解析により検討し、DNA 付加体の生成を指標とした有害性評価の検証を行なう。

### B．研究方法

雄性 SD ラット（各群それぞれ 5 匹）に遺伝毒性肝発がん物質；2-Nitropropane(2-NP；陽性対照), *o*-Aminoazotoluene(AAT), Dimethylnitrosamine(DMN), 4,4'-Thiodianiline(TDA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosodiethanolamine(NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine(NEMA), Nitrosodibutylamine(NB), N-Nitrosopyrrolidine(NNP), 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene(MDA)、遺伝毒性非発がん物質；Cyclophosphamide(CPA), Nitrofurantoin(NFT), Phenacetin(PCT)、非遺伝毒性肝発がん物質；Monocrotaline(MCT), Phenobarbital(PB)、非遺伝毒性非肝発がん物質；Diazepam(DZP), Disulfiram(DSF), Phenytoin(PHE), Rotenone(ROT), Tolbutamide(TLB),

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

次に、得られたデータから、対照群である2-NPおよびMCを除いた、146サンプルのデータを用いた。各曝露群について、全データの3/4を訓練データに、残りの1/4をテストデータに、それぞれ分配し、機械学習の訓練データおよびテストデータの作成を行った。遺伝毒性、肝発がん性、遺伝毒性/肝発がん性を付加体から予測するモデルを、教師あり機械学習手法を用いて試作した。学習アルゴリズムとしては、ランダムフォレストを使用した。さらに、実際に予測モデルを使用する場合には遺伝毒性/肝発がん性の情報がない化学物質に対して実施することを想定して、Leave-One-Out交差検証により予測結果の精度評価を行った。Leave-One-Out交差検証は、ある曝露物質のデータをテスト用とし、他の曝露物質のデータを用いて学習したモデルの精度を評価することを、物質を変えながら繰り返す検証方法であり、毒性が未知の物質に対する予測を模擬した精度評価方法である。

#### (倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

各種化学物質を投与したラット肝臓DNAのアダクトーム解析を行なった結果を図1に示す。LDA解析を行なったところ、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに綺麗に分離されることがわかった。

#### 1) 遺伝毒性の予測結果

genotoxicity予測モデルを用いて、テストデータの29サンプルに対して予測を行った結果、27サンプルに対して正答となった(93%、表2)。

#### 2) 肝発がん性の予測結果

毒性予測モデルを用いて、テストデータの29サンプルに対して予測を行った結果、28サンプルに対して

正答となった(97%、表3)。

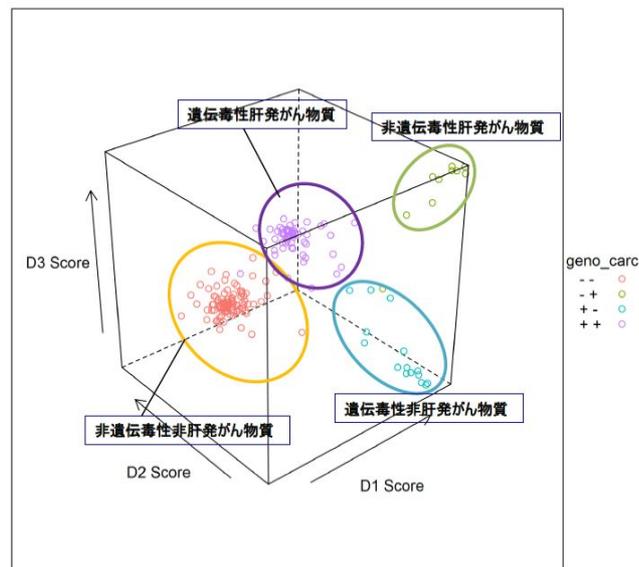
#### 3) 遺伝毒性/肝発がん性の予測結果

毒性予測モデルを用いて、テストデータの29サンプルに対して予測を行った結果、27サンプルに対して正答となった(93%、表4)。

表1 使用した化学物質

	遺伝毒性	発がん性	投与量 (mg/kg bw)
o-Aminobenzoic acid (OAA)	+	+	500
Dimethylacetamide (DMAc)	+	+	10
4,4'-Thiodianiline (TDA)	+	+	300
2-Nitropropane (2-NP, 降性肝発がん)	+	+	240
N-Nitrosodimethylamine (NDEA)	+	+	70
N-Nitrosodimethylamine (NDEA)	+	+	2000
N-Nitrosodimethylamine (NDEA)	+	+	30
Nitrosodimethylamine (NDMA)	+	+	400
N-Nitrosopyrrolidine (NDP)	+	+	300
β-Methyl-4-dimethylaminoacetamide (MDDA)	+	+	500
Cyclophosphamide (CPA)	+	-	30
Nitrosamine (NT)	+	-	200
Phenacetin (PC)	+	-	550
Mecloretin (MCT)	-	-	20
Phenobarbital (PB)	-	+	50
Diazepam (DZP)	-	-	80
Diazepam (DZP)	-	-	170
Phenacetin (PC)	-	-	550
Racemone (RAC)	-	-	20
Telluramide (TLB)	-	-	830
Aspirin (ASA)	-	-	70
Tetrazolone (TRZ)	-	-	130
Indomethacin (IM)	-	-	1
Phenylbutazone (PhB)	-	-	80
Promethazine (PMZ)	-	-	180
Sulindac (SUL)	-	-	90
Tetracycline (TC)	-	-	270
Ethionamide (ETH)	-	-	440
Theophylline (TEO)	-	-	80
Caffeine (CAF)	-	-	60
Chloramphenicol (CMP)	-	-	830
β-Methyl-4-dimethylaminoacetamide (MDDA, 対照群)	-	-	5mg/kg

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



#### 4) Leave-One-Out 交差検証による予測結果の精度評価

Leave-One-Out 交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施した。なお、訓練データとテストデータは対照群を含まない。結果を表5に示すが、Leave-One-Out 交差検証を用いるとわずかに正答率が減少した。具体的には、genotoxicity/carcinogenicityの予測結果は3%、genotoxicityの予測結果は7%、carcinogenicity

の予測結果は7%減少した。

表2 遺伝毒性の予測結果

exposure	sample_no	truth	pred	correct
AAT	1	+	+	1
DMN	5	+	+	1
TDA	2	+	+	1
NDEA	2	+	+	1
NDELA	5	+	+	1
NEMA	5	+	+	1
NB	3	+	+	1
NNP	2	+	+	1
CPA	2	+	+	1
NFT	3	+	+	1
PCT	4	+	+	1
MCT	2	-	+	0
PB	2	-	+	0
DZP	4	-	-	1
DSF	3	-	-	1
PHE	1	-	-	1
ROT	5	-	-	1
TLB	5	-	-	1
ASA	2	-	-	1
TRI	5	-	-	1
IM	3	-	-	1
PhB	5	-	-	1
PMZ	3	-	-	1
SUL	5	-	-	1
TC	5	-	-	1
ETH	2	-	-	1
TEO	4	-	-	1
CAF	2	-	-	1
CMP	4	-	-	1

(灰色：誤答)

表3 肝発がん性の予測結果

exposure	sample_no	truth	pred	correct
AAT	1	+	+	1
DMN	5	+	+	1
TDA	2	+	+	1
NDEA	2	+	+	1
NDELA	5	+	+	1
NEMA	5	+	+	1
NB	3	+	+	1
NNP	2	+	+	1
CPA	2	-	-	1
NFT	3	-	-	1
PCT	4	-	-	1
MCT	2	+	-	0
PB	2	+	+	1
DZP	4	-	-	1
DSF	3	-	-	1
PHE	1	-	-	1
ROT	5	-	-	1
TLB	5	-	-	1
ASA	2	-	-	1
TRI	5	-	-	1
IM	3	-	-	1
PhB	5	-	-	1
PMZ	3	-	-	1
SUL	5	-	-	1
TC	5	-	-	1
ETH	2	-	-	1
TEO	4	-	-	1
CAF	2	-	-	1

CMP 4 - - 1

(灰色：誤答)

表4 遺伝毒性/肝発がん性の予測結果

exposure	sample_no	truth	pred	correct
AAT	1	++	++	1
DMN	5	++	++	1
TDA	2	++	++	1
NDEA	2	++	++	1
NDELA	5	++	++	1
NEMA	5	++	++	1
NB	3	++	++	1
NNP	2	++	++	1
CPA	2	+-	+-	1
NFT	3	+-	+-	1
PCT	4	+-	+-	1
MCT	2	-+	-+	0
PB	2	-+	-+	0
DZP	4	--	--	1
DSF	3	--	--	1
PHE	1	--	--	1
ROT	5	--	--	1
TLB	5	--	--	1
ASA	2	--	--	1
TRI	5	--	--	1
IM	3	--	--	1
PhB	5	--	--	1
PMZ	3	--	--	1
SUL	5	--	--	1
TC	5	--	--	1
ETH	2	--	--	1
TEO	4	--	--	1
CAF	2	--	--	1
CMP	4	--	--	1

(灰色：誤答)

表5 DNA アダクトーム解析の毒性予測結果の精度評価の比較

	訓練データとテストデータに当該曝露物質を含む交差検証			Leave-One-Out 交差検証		
	正答数	合計サンプル数	正答率	正答数	合計サンプル数	平均的な正答率
geno_carc	27	29	93%	131	146	90%
geno	27	29	93%	125	146	86%
carc	28	29	97%	131	146	90%

#### D. 考察

29種の遺伝毒性/非遺伝毒性非肝発がん物質を投与したラットの肝臓からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅解析を行なった。得られたデータを用いてLDA解析を行った。その結果、遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質の4つのグループに分離できた。アダクトームデータの一部を教師データとして化学物質の遺伝毒性/発がん性を予測するモデルを機械学習手法(アルゴリズムとしてはランダムフォレストを使用)を用いて試作した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いてテストデータに対して予測を行ったところ、93%以上の正解率が得られた。また、Leave-One-Out交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、わずかに正答率が減少した。予測精度をさらに向上させるためには、説明変数の加工、学習アルゴリズムの変更、チューニングなどの学習方法を改良する必要がある。さらに、訓練データの増加も必要であると思われる。特に、今回、いずれの予測モデル

においても予測に失敗した化学物質物質(MCT, PB)は、非遺伝毒性発がん物質である。この結果は、データが他の化学物質に比べ極端に少ないことが予測度を低くしている可能性を示唆している。今回、この2種しか非遺伝毒性発がん物質の暴露は行なっておらず、同カテゴリーのサンプルを追加することが、予測精度を上げるためにも重要であると考えられる。

## E. 結論

遺伝毒性ラット肝発がん物質として、2-NP(陽性対照)、AAT, DMN, TDA, NDEA, NDELA, NEMA, NB, NNP, MDA、遺伝毒性非発がん物質として、CPA, NFT, PCT、非遺伝毒性肝発がん物質として、MCT, PB、非遺伝毒性非肝発がん物質としてDZP, DSF, PHE, ROT, TLB, ASA, TRI, IM, PhB, PZ, S UL, TC, ETH, TEO, CAF, CMPをそれぞれラットに投与し、24時間後に肝臓に生成されるDNA付加体を網羅的に解析した。得られたデータを用いてLDA解析を行ったところ、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。次に、得られたデータの一部を使用して、遺伝毒性、肝発がん性、遺伝毒性/肝発がん性を付加体から予測するモデルを、教師あり機械学習手法を用いて試作した。学習アルゴリズムとしては、ランダムフォレストを使用した。アダクトームデータの一部を教師データとして化学物質の遺伝毒性/発がん性を予測するモデルを機械学習手法(アルゴリズムとしてはランダムフォレストを使用)を用いて試作した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いてテストデータに対して予測を行ったところ、93%以上の正解率が得られた。また、Leave-One-Out交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、わずかに正答率が減少した。今回、いずれの予測モデルにおいても予測に失敗した化学物質物質(MCT, PB)は、非遺伝毒性発がん物質である。同カテゴリーのサンプルを追加することが、必要であると考えられた。

現在、アダクトームデータに化学物質構造データを追加し、予測精度の向上について検討中である。また、各グループの予測に重要な付加体の探索を行うと同時に、更に化学物質の数を増やし、予測精度の向上について検討を行う予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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 in press.
- 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(3): 279-287.

- 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; 32(8): 1515-1527.
  - 4) 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; 847: 403022.
  - 5) Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl-*-*carboline derivatives formed from co-mutagenic action of *-*carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review. *Mutation Res*. 2020; 850-851: 503148.
- ### 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、第78回日本癌学会学術総会、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 Practice 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 会議に参加してー 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、第46回日本毒性学会学術年会、徳島(2019年6月)

該当なし。

**2. 実用新案登録**

該当なし。

**3. その他**

該当なし。

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

**1. 特許取得**

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

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

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pottinger KL, Kaueke H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S.	Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo.	Toxicology			In press
Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Otagawa K.	Dose dependency of -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with genotoxic and nongenotoxic bladder carcinogens.	J Appl Toxicol			In press
Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H	Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model.	Arch Toxicol	94	927-37	2020
Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Mizurubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, and Tsuchihara K.	Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multiple lesion mutational profiles.	Carcinogenesis	3	368-376	2020

Furihata C, You X, <u>Toyoda T</u> , Oga wa K, Suzuki T.	Using FFPE RNA-Seq with 12 marker genes to evaluate genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens.	Genes Environ	42	15	2020
Teramoto A, <u>Tsukamoto T</u> , Yamada A, Kiriya Y, Imaizumi K, Saito K, Fujita H,	Deep learning approach to classification of lung cytological images: Two-step training using actual and synthesized images by progressive growing of generative adversarial networks.	PLoS One	15	e0229951	2020
Totsuka Y, Wakabayashi K.	Biological significance of aminophenyl-carboline derivatives formed from co-mutagenic action of -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review.	Mutation Res	850-851	503148	2020
Yukimatsu N, <u>Gi M</u> , Okuno T, Fujioka M, <u>Suzuki S</u> , Kakehashi A, Yamaguchi Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, <u>Wanibuchi H</u> .	Promotion effects of acetoacetato-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats.	Arch Toxicol	93	3617-3631	2019
Yoshida K, <u>Gi M</u> , Fujioka M, Teramoto I, <u>Wanibuchi H</u>	Long-term administration of excess zinc impairs learning and memory in aged mice.	J Toxicol Sci	44	681-691	2019
Yamaguchi T, <u>Gi M</u> , Fujioka M, Taguchi Y, Kakehashi A, <u>Wanibuchi H</u> .	A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in the drinking water of C57BL/6J mice for 52 weeks.	J Toxicol Pathol	32	127-134	2019
Takakuwa T, Okuno T, Nishimoto M, Nanno S, Takeoka Y, Nakashima Y, Koh H, Nakane T, <u>Wanibuchi H</u> , Hino M, Nakamae H.	[Refractory ascites caused by lymphatic flow disorder after stem cell transplantation for acute myeloid leukemia].	Rinsho Ketsueki	60	12-16	2019

Osawa T, Shimamura T, Saito K, Hasegawa Y, Ishii N, Nishida M, Ando R, Kondo A, Anwar M, Tsuchida R, Hino S, Sakamoto A, Igarashi K, Saitoh K, Katato K, Endo K, Yamano S, Kanki Y, Matsumura Y, Minami T, Tanaka T, Anai M, Wada Y, Wanibuchi H, Hayashi M, Hamada A, Yoshida M, Yachida S, Nakao M, Sakai J, Aburatani H, Shibuya M, Hanada K, Miyano S, Soga T, Kodama T.	Phosphoethanolamine Accumulation Protects Cancer Cells under Glutamine Starvation through Downregulation of PCYT2.	Cell Rep	29	89-103 e107	2019
Okuno T, Yashiro M, Masuda G, Torigano S, Kuroda K, Miki Y, Hirakawa K, Ohsawa M, Wanibuchi H, Ohira M.	Establishment of a Novel Scirrhous Gastric Cancer Cell Line with FGFR2 Overexpression, OCUM-14.	Ann Surg Oncol	26	1093-1102	2019
Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatsu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, Wanibuchi H.	Acetoaceto-o-Toluidide Enhances Cellular Proliferative Activity in the Urinary Bladder of Rats.	Toxicol Sci	169	456-464	2019
Ohira T, Kojima H, Kuroda Y, Aoki S, Inaoka D, Ogasaki M, Wanibuchi H, Okada F, Oshimura M, Kugoh H.	PITX1 protein interacts with ZCCHC10 to regulate hTERT mRNA transcription.	PLoS One	14:	e0217605	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-f]quinoline in F344 gpt delta transgenic rats.	Mutagenesis	34	279-287	2019

Suzuki S, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Akagi JI, Cho YM, Ogawa K, Takahashi S.	Dimethylarsinic acid may promote prostate carcinogenesis in rats.	J Toxicol Pathol	32	73-7	2019
Okabe A, Kiriyama Y, Suzuki S, Sofukurai K, Teramoto A, Kato H, Naiki-Ito A, Tahara S, Takahashi S, Kuroda M, Sugioaka A, Tsukamoto T.	Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker gamma-H2AX.	J Toxicol Pathol	32	91-9	2019
Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Takase H, Harose A, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Tsuda H.	MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats.	Cancer Sci	110	2485-92	2019
Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P.	Cyclohexanone curcumin analogs inhibit the progression of castration-resistant prostate cancer in vitro and in vivo.	Cancer Sci	110	596-607	2019
Kobayashi M, Inaguma S, Raffeld M, Kato H, Suzuki S, Wakasugi T, Mitsui A, Kuwabara Y, Lasota J, Ikeda H, Miettinen M, Takahashi S.	Epithelioid variant of gastrointestinal stromal tumor harboring PDGFRA mutation and MLH1 gene alteration: A case report.	Pathol Int	69	541-6	2019
Etani T, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki T, Iida K, Nozaki S, Katano H, Nagayasu Y, Suzuki S, Kawahashi N, Yasui T, Takahashi S.	NCL1, A Highly Selective Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apoptosis and Autophagy.	J Clin Med.	8	442	2019

Matsushita K, <u>To</u> <u>yoda T</u> , Yamada T, Morikawa T, O gawa K.	Comprehensive express ion analysis of mRNA and microRNA for inve stigation of compensa tory mechanisms in th e rat kidney after un ilateral nephrectomy.	J Appl Toxicol	132	110643	2019
Matsushita K, <u>To</u> <u>yoda T</u> , Morikawa T, Ogawa K.	A 13-week subchronic toxicity study of van illin propylene glycol acetal in F344 rat s.	Food Chem Toxicol	132	110643	2019
<u>Toyoda T</u> , Matsus hita K, Morikawa T, Yamada T, Mi yoshi N, Ogawa K.	Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and -H2AX formation in th e rat urinary bladder treated with <i>o</i> -tolui dine and <i>o</i> -anisidine.	Arch Toxicol	93	753-62	2019
<u>Toyoda T</u> , Cho Y M, Matsushita K, Tachibana S, Sey numa M, Akagi J, Ogawa K.	A 13-week subchronic toxicity study of hex yl acetate in SD rat s.	J Toxicol Pat	32	205-12	2019
Sone M, <u>Toyoda</u> T, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Mor ikawa T, Nishika wa A, Ogawa K.	Immunohistochemistry of -H2AX as a metho d of early detection of urinary bladder ca rcinogenicity in mic e.	J Appl Toxicol	39	868-76	2019
Yang Q, Yasuda T, Choi E, <u>Toyod</u> <u>a T</u> , Roland JT, Uchida E, Yoshid a H, Seto Y, Gol denring JR, Nom ura S.	MEK inhibitor reverse s metaplasia and allo ws re-emergence of no rmal lineages in <i>Helicobacter pylori</i> -infec ted gerbils.	Gastroenterol ogy	156	577-81	2019
Hirata T, Cho Y M, Suzuki I, <u>Toy</u> <u>oda T</u> , Akagi J, Nakamura Y, Num sawa S, Ogawa K.	4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTB ITC) induced apoptoti c cell death and G2/M cell cycle arrest vi a ROS production in h uman esophageal epith elial cancer cells.	J Toxicol Sci	44	73-81	2019

Funahashi S, Okazaki Y, Nagai H, Chew SH, Ogawa K, <u>Toyoda T</u> , Chou YM, Toyokuni S.	Twist1 was detected in mesenchymal cells of mammary fibroadenoma and invasive components of breast carcinoma in rats.	J Toxicol Pathol	32	19-26	2019
Nakagawa M, Sakai Y, Kiriyama Y, Tahara T, Horiguchi N, Okabe A., Tahara S, Shibata T, Ohmiya N, Kuroda M, Sugioaka A, <u>Tsukamoto T.</u>	Eradication of Helicobacter pylori Induces Immediate Regressive Changes in Early Gastric Adenocarcinomas.	Pathobiology	86	135-144	2019
Okabe A, Kiriyama Y, Suzuki S, Sakurai K, Teramoto A, Kato H, Naito A, Tahara S, Takahashi S, Kuroda M, Sugioaka A, <u>Tsukamoto T.</u>	Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker gamma-H2AX.	J Toxicol Pathol	32	91-99	2019
Tahara S, Tahara T, Horiguchi N, Kato T, Shinkai Y, Yamashita H, Yamada H, Kawamura T, Terada T, Okubo M, Nagasaka M, Nakagawa Y, Shibata T, Yamada S, Urano M, <u>Tsukamoto T</u> , Kurahashi H, Kuroda M, Ohmiya N.	DNA methylation accumulation in gastric mucosa adjacent to cancer after Helicobacter pylori eradication.	Int J Cancer	144	80-88	2019
<u>Totsuka Y</u> , 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 (8)	1515-1527	2019

<p>Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thibaud V, White P, Yauk CL.</p>	<p>High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT).</p>	<p>Mutation Res</p>	<p>847</p>	<p>403022</p>	<p>2019</p>
--	--	---------------------	------------	---------------	-------------

令和2年3月27日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人 大阪

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 西澤 良記



次の職員の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等の管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人 大阪

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 西澤 良記



次の職員の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等の管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人 大阪

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 西澤 良記



次の職員の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等の管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和2年3月27日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏



次の職員の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等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター病理部 室長  
(氏名・フリガナ) 豊田 武士 (トヨタ タケシ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、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 5 月 7 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 藤田医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 才藤 栄一



次の職員の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等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 医学部病理診断学・教授

(氏名・フリガナ) 塚本 徹哉・ツカモトテツヤ

#### 4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

#### 6. 利益相反の管理

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

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

2020年 1月 16日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人香川大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 寛 善行



次の職員の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等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 香川大学医学部腫瘍病理学・准教授

(氏名・フリガナ) 横平 政直・ヨコヒラ マサナオ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

2020年4月1日

国立医薬品食品衛生研究所 殿

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



次の職員の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等の管理については以下のとおりです。

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