

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

平成29年度～令和元年度 総合研究報告書

研究代表者 鱈淵 英機

令和2年（2020）年 5月

目 次

I . 総合研究報告	
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 . 分担総合研究報告	
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	----- 17
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	----- 25
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	----- 29
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	----- 35
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	----- 40
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	----- 45
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	----- 48
戸塚ゆ加里	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 57

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、 γ -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。ラットを用いた28日間反復経口投与試験を実施し、膀胱発がん物質を含む65物質について検討した結果、 γ -H2AX免疫染色によって化学物質のラット膀胱に対する発がん性を、感度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。加えて、「膀胱における γ -H2AX免疫染色」を、28日間反復経口投与毒性試験に対する既存のOECDテストガイドライン(TG 407)に、オプションとして追加する改定案(Standard Project Submission Form; SPSF)を厚生労働省を通じて提出した。また、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性の検証では、遺伝毒性肝発がん物質等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、予測モデルで肝発がん性を予測させた。その結果、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年度から令和元年度にかけて、膀胱発がん物質35種および非膀胱発がん物質30種について、ラット28日間反復投与試験を実施し、 γ -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するために、 γ -H2AXの陽性率と用量相関性について検討した（国立衛研/豊田、大阪市立大/鈴木）。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、平成29年度から30年度にかけて、遺伝毒性肝発がん物質23種及び37種類のそれ以外の化合物（非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の発がん物質、非発がん物質）について、ラット単回投与試験を行い、得られた遺伝子発現データを予測モデルに入力し、判

定を行った。令和元年度には、これまでに偽陰性となった6化学物質に対して、投与用量を上げて検証した(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. γ -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、8種類の膀胱発がん物質：4-Amino-2-nitrophenol (ANP)、Disperse blue 1 (DB1)、*N*-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)、*N*-Ethyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (EHBN)、Cyclophosphamide monohydrate (CPA)、2-Nitrosotoluene (2-NT)、*m*-Cresidine (*m*-Cre)、Sulfasalazine (SSZ)、膀胱発がんプロモーター物質1種：Sodium L-ascorbate (Na-AsA)及び非膀胱発がん物質6種：2-Nitropropane (2-NP)、Ethinamide (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行った。

大阪市立大担当分として、10種類の膀胱発がん物質：1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ)、Phenacetin (PNC)、*N*-Nitrosodiphenylamine (NDPA)、Sodium *o*-phenylphenol (SOPP)、11-Aminoundecanoic acid (AUDA)、*N*-Butyl-*N*-(3-carboxypropyl)nitrosamine (BCPN)、1-Naphtyl-*N*-methylcarbamate (Carbaryl)、Tributyl phosphate (TBP)、Pioglitazone (PGZ)、Sodium arsenite (NaAsO₂)、膀胱発がんプロモーター物質1種：Saccharin sodium salt dihydrate (Na-Sac)及び非膀胱発がん物質4種：4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO)、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行った。

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 γ -H2AX形成を検討した。

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)

平成29年度から30年度には、遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質合計60種類について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。動物試験は3施設(香川大・藤田医科大・大阪市立大)で行われた。実験動物は6週齢の雄SDラットを用いた。動物試験プロトコルは事前に共有・配布し、プロトコルに従い試験を実施した。投与濃度は各物質LD50の1/3とした。令和元年度は、前年度までに偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質6種について、投与濃度を各物質LD50の1/2および2/3に設定し行った。

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の大きさに2スライス切り出し、それぞれ1mLのRNAlaterが入った1.5mLチューブへ移した(合計2本、そのうち1本は、他施設でのバリデーション用)。1.5mLチューブを4°Cで一晩保管後、-80°C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°C凍結保管した(一本はDNA adduct 解析用)。ホルマリン固定用サンプルとして、外側左葉の下半分、内側右葉(RM)及び右葉尾部(R2)から計3スライス切り出し、カセットにおいて10%ホルマリンにて固定した。

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

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

3. DNAアダクトーム解析による遺伝毒性評価(鰐淵、戸塚)

平成29年度から令和元年度にかけて、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), Ethinamide (ETH), Theophylline (TEO), Caffeine (CAF), Chloramphenicol (CMP))を投与したラット肝臓よりDNAを抽出した。DNAを抽出後、DNaseI、ヌクレアーゼP1、アルカリホスファターゼ、

ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、LC-TOF MS に供し DNA 付加体の網羅解析を行った。なお、コントロールとして 0.5%メチルセルロースを用いた。得られたデータは SCIEX 社が提供するバイオインフォマティクス解析ソフトウェアを用い、デオキシリボヌクレオチドに特徴的なニュートラルロス (-116.04736) 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. γ -H2AX を用いた膀胱発がんリスク評価法の確立 (豊田、鈴木)

平成 29 年度から令和元年度までの実験により、膀胱粘膜上皮における γ -H2AX 形成を免疫組織化学的に検討した結果、膀胱発がん物質 18 物質中 14 物質で有意に増加した。一方で、非膀胱発がん物質 10 物質ではいずれも対照群と有意な差は認められなかった。

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、 γ -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、 γ -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 1)。

平成 30 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 γ -H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与毒性試験に対する既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に、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 2)。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 γ -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。そこで令和元年度には、非膀胱発がん物質での検討を増やすとともに、遺伝毒性膀胱発がん物質 BBN および非遺伝毒性膀胱発がん物質メラミンを用いて用量相関性を検討した。

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 γ -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。

		ラット膀胱に対する発がん性	
		+	-
膀胱上皮における γ -H2AX 形成	+	29 2-NA, 2-AAF, BCPN, BBN, o-Anisidine, DHPN, EHPN, APNH, p-Cre, COP, PEITC, DMAB, CPA, 2-NT, o-Toluidine, BOP, DBI, MNU, TBP, Carbaryl, Melamine, Uracil, NTA, ADBAQ, PNC, AUDA, SOPP, NDPA, iAs(III)	0
	-	6 ANP, NMOR, DMA, m-Cre, SSZ, PGZ	30 DMN, 2,4-Xylydine, PhIP, DMBA, Glycidol, MNNG, 2-NP, 4NQO, ENU, DMH, DEN, DMB, TBPP, KBrO ₃ , AA, p-Toluidine, 2,6-DAT, 5-FU, 6-MP, Aniline, d-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 1. γ -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

OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME
Standard Project Submission Form

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

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

SUBMITTED BY (Country / European Commission / Secretariat)
Japan

DATE OF SUBMISSION TO THE SECRETARIAT
31 October 2018

DETAILS OF LEAD COUNTRY/CONSORTIUM

Country/Organisation:	Japan
Agency/ministry/Other:	National Institute of Health Sciences, NIHS / Ministry of Health, Labour and Welfare, MHLW
Mail Address:	NIHS: 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan/ MHLW: 1-2-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8916, Japan
Phone/fax:	NIHS: (phone) +81-44-270-6651, (fax) +81-44-270-6655/ MHLW: (phone) +81-3-3595-2298
Email:	NIHS: h.yoda@nihs.go.jp MHLW: tsukano-masasaki12@mhlw.go.jp

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

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

各施設で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った。本モデルでは、遺伝毒性肝発がん物質を「陽性」、その他の物質 (非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の発がん物質、非発がん物質) を「陰性」と判定する。

平成 29 年度は、全ての遺伝毒性肝発がん物質 (11 物質) について陽性判定が得られ (感度 100%)、遺伝毒性陰性の非発がん物質 20 物質のうち、Ethionamide

を除く 19 物質で陰性判定が得られた（特異度 95%）。平成 30 年度は、遺伝毒性肝発がん物質 12 物質のうち、6 物質について陽性判定が得られ（感度 46%）、その他の全ての物質（17 物質）で陰性判定が得られた（特異度 100%）。令和元年度では、偽陰性であった 6 物質のうち、Hydrazine sulfate については、LD50 の 1/2 および 2/3 投与量で、Dichloroacetic acid については LD50 の 2/3 投与量で、陽性となった。

以上より、検討した 60 物質での結果は、感度 82.6%(19/23) (表 1)、特異度 97.3%(36/37) (表 2) となった。

表 1. 遺伝毒性肝発がん物質の判定結果

被検物質	判定結果	正否
2-Nitropropane (2-NP) (陽性対照物質)	Positive	○
N-Nitrosodiethylamine (NDEA)	Positive	○
Nitrosoheptamethylenimine (NHMI)	Positive	○
N-Nitrosodiethanolamine (NDELA)	Positive	○
N-Nitrosoethylmethylamine (DEMA)	Positive	○
Nitrosodibutylamine (DBA)	Positive	○
N-Nitrosopyrrolidine (NPNR)	Positive	○
3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (DMAB)	Positive	○
o-Aminoazotoluene (AAT)	Positive	○
N-Nitrosodimethylamine (DMN)	Positive	○
4,4'-Thiodianiline (TDA)	Positive	○
Benzidine (BZ)	Negative	×
Auramine-O (AO)	Positive	○
Hydrazine (HZ)	Negative	×
4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)	Negative	×
Monocrotaline (MCT)	Positive	○
4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline) (MBOCA)	Positive	○
Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate (TDCPP)	Positive	○
Retrorsine (RTS)	Positive	○
Vinyl bromide (VB)	Negative	×
Dichloroacetic acid (DCA)	Positive	○
Hydrazine sulfate (HS)	Positive	○
Acid Red 26 (AR-26)	Positive	○

3. DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価（縹淵、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 3 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 3 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. その他の物質の判定結果

被検物質	判定結果	正否
Ames(-)/肝発がん性(+)		
Phenobarbital (PB)	Negative	○
Hexachlorobenzene (HCB)	Negative	○
Carbon tetrachloride (CCL4)	Negative	○
Gemfibrozil (GFZ)	Negative	○
Ethinylestradiol (EE)	Negative	○
Coumarin	Negative	○
Ames(+)/肝以外の臓器発がん性(+)		
Cyclophosphamide (CPA)	Negative	○
Nitrofurantoin (NFT)	Negative	○
Phenacetin (PCT)	Negative	○
Ethylene thiourea (ETU)	Negative	○
Ames(+)/発がん性(-)		
2,4-Dinitrotoluene (DNT)	Negative	○
Isoniazid (INH)	Negative	○
Ames(-) 肝以外の臓器発がん性(+)		
Indomethacin (IM)	Negative	○
Phenylbutazone (PhB)	Negative	○
Butylated hydroxyanisole (BHA)	Negative	○
Methimazole (MTZ)	Negative	○
Sulfasalazine (SS)	Negative	○
Ames(-)/発がん性(-)		
Diazepam (DZP)	Negative	○
Disulfiram (DSF)	Negative	○
Phenytoin (PHE)	Negative	○
Rotenone (ROT)	Negative	○
Tolbutamide (TLB)	Negative	○
Aspirin (ASA)	Negative	○
Triamterene (TRI)	Negative	○
Promethazine (PMZ)	Negative	○
Sulindac (SUL)	Negative	○
Tetracycline (TC)	Negative	○
Ethionamide (ETH)	Positive	×
Theophylline (TEO)	Negative	○
Caffeine (CAF)	Negative	○
Chloramphenicol (CMP)	Negative	○
Allyl alcohol (AA)	Negative	○
Furosemide (FUR)	Negative	○
Chlorpheniramine (CHL)	Negative	○
Chlorpropamide (CPP)	Negative	○
Methyldopa (MDP)	Negative	○

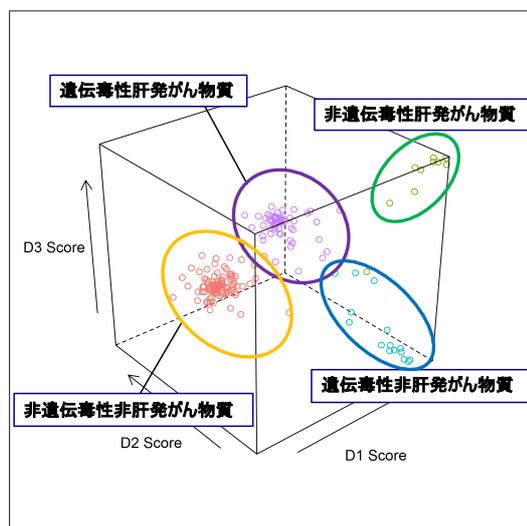


図 3. 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価(LDA 解析による)

表 3. DNA アダクトーム解析による**遺伝毒性/肝発がん性**評価

		解析結果			
		+/+	+/-	-/+	-/-
実際の分類	+/+	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、 γ -H2AX 免疫染色によって化学物質のラット膀胱に対する発がん性を、感度 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 γ -H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与毒性試験に対する既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に追加する改定案 (Standard Project Submission Form; SPSF) を、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 γ -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・機関からレビューコメントを頂いた。令和元年度に、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 γ -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、 γ -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、平成 29 年度から 30 年度に合計 60 物質の検証を行い、遺伝毒性肝発がん物質を、感度 73.9% (17/23) および特異度 97.3% (36/37) で検出することが出来た。令和元年度には、偽陰性となった 6 物質について投与濃度を上げて検証した結果、2 物質については陽性と判定された。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。

E. 結論

本研究の結果から、 γ -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 γ -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- β -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review. *Mutation Res*. 2020; 850–851: 503148.
 - 7) Teramoto A, Tsukamoto T, 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*. 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, 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.
 - 15) 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.
 - 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. 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: 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 γ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with σ -toluidine and σ -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 γ -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.
- 36) Okuno T, Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. mTOR Activation in Liver Tumors Is Associated with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Both Mouse Models and Humans. *Cancers (Basel).* 2018; 10: 465.
- 37) Gi M, Fujioka M, Yamano S, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Yamaguchi T, Tago Y, Kitano M, Hayashi SM, Wanibuchi H. Chronic dietary toxicity and carcinogenicity studies of dammar resin in F344 rats. *Arch Toxicol.* 2018; 92: 3565-83.
- 38) Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. In vivo positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats. *Arch Toxicol.* 2018; 92: 3207-21.

- 39) Fukushima S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Matsumoto M. Quantitative Approaches to Assess Key Carcinogenic Events of Genotoxic Carcinogens. *Toxicol Res.* 2018; 34: 291-6.
- 40) Shimizu Y, Tamada S, Kato M, Takeyama Y, Fujioka M, Kakehashi A, Nakatani T, Wanibuchi H, Gi M. Steroid sulfatase promotes invasion through epithelial-mesenchymal transition and predicts the progression of bladder cancer. *Exp Ther Med.* 2018; 16: 4463-70.
- 41) Oikawa D, Shiota M, Tokunaga F, Wanibuchi H. Generation of Rat Monoclonal Antibodies Specific for DZIP3. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2018; 37: 153-7.
- 42) Oikawa D, Shiota M, Goto E, Komakura K, Wanibuchi H, Tokunaga F. Generation of Rat Monoclonal Antibodies Against a Deubiquitinase, Ovarian Tumor Domain-Containing Protein 1. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2018; 37: 180-4.
- 43) Kitajima S, Lee KL, Fujioka M, Sun W, You J, Chia GS, Wanibuchi H, Tomita S, Araki M, Kato H, Poellinger L. Hypoxia-inducible factor-2 alpha up-regulates CD70 under hypoxia and enhances anchorage-independent growth and aggressiveness in cancer cells. *Oncotarget.* 2018; 9: 19123-35.
- 44) Takeshita S, Yamashita Y, Shiomi K, Suzuki N, Yoshida J, Naiki-Ito A, Suzuki S, Akatsuka S, Toyokuni S, Takahashi T, Mase S, Arakawa A, Sugiura-Ogasawara M, Takahashi S. Expression of P-REX2a is associated with poor prognosis in endometrial malignancies. *Oncotarget.* 2018; 9: 24778-86.
- 45) Suzuki S, Kato H, Fuji S, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Early detection of prostate carcinogens by immunohistochemistry of HMGB2. *J Toxicol Sci.* 2018; 43: 359-67.
- 46) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Kato H, Fuji S, Pennington KL, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis. *Toxicology.* 2018; 398-399: 31-40.
- 47) Naiki T, Naiki-Ito A, Iida K, Etani T, Kato H, Suzuki S, Yamashita Y, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis. *Oncotarget.* 2018; 9: 15847-59.
- 48) Kuno T, Kato H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Tanaka T, Takahashi S, Mori H. Preventive Effects of Fermented Brown Rice and Rice Bran on Spontaneous Lymphomagenesis in AKR/NSlc Female Mice. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018; 19: 3217-23.
- 49) Ito Y, Naiki-Ito A, Kato H, Suzuki S, Kuno T, Ishiguro Y, Takahashi S, Uemura H. Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by the down-regulation of the androgen receptor. *Oncotarget.* 2018; 9: 13859-69.
- 50) Hayashi Y, Nishiyama T, Nakatochi M, Suzuki S, Takahashi S, Sugiura-Ogasawara M. Association of genetic variants of PD1 with recurrent pregnancy loss. *Reprod Med Biol.* 2018; 17: 195-202.
- 51) Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of acetaminophen using an obese rat model. *J Toxicol Sci.* 2018; 43: 423-33.
- 52) Tanoue Y, Toyoda T, Sun J, Mustofa MK, Tateishi C, Endo S, Motoyama N, Araki K, Wu D, Okuno Y, Tsukamoto T, Takeya M, Ihn H, Vaziri C, Tateishi S. Differential roles of Rad18 and Chk2 in genome maintenance and skin carcinogenesis following UV exposure. *J Invest Dermatol.* 2018; 138: 2550-7.
- 53) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Takahashi M, Inoue K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-ethylbutanal in F344 rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018; 100: 118-26.
- 54) Akagi J, Cho YM, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Subchronic toxicity evaluation of 5-hexenyl isothiocyanate, a nature identical flavoring substance from *Wasabia japonica*, in F344/DuCrj rats. *Food Chem Toxicol.* 2018; 122: 80-6.
- 55) Furihata C, Toyoda T, Ogawa K, Suzuki T. Using RNA-Seq with 11 marker genes to evaluate 1,4-dioxane compared with typical genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens. *Mutat Res.* 2018; 834: 51-5.
- 56) Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from *o*-toluidine and aniline. *J Appl Toxicol.* 2018; 38: 537-43.
- 57) Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Sone M, Ogawa K. Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol.* 2018; 31: 73-80.
- 58) Hirata T, Cho YM, Suzuki I, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate mediates nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 activation by regulating reactive oxygen

- species production in human esophageal epithelial cells. *Food Chem Toxicol.* 2018; 111: 295-301.
- 59) 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.
- 60) Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two nonharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology.* 2018, 38: 537-543.
- 61) Fukai, E, Sato, H, Watanabe, M, Nakae, D, Totsuka Y, Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.* 2018; 109: 1024-1031.
- 62) Kataoka H, Miura Y, Kawaguchi M, Suzuki S, Okamoto Y, Ozeki K, Shimura T, Mizoshita T, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Asai K, Joh T. Expression and subcellular localization of AT motif binding factor 1 in colon tumours. *Mol Med Rep.* 2017; 16: 3095-102.
- 63) Tachibana H, Gi M, Kato M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers. *Cancer Sci.* 2017; 108, 331-337.
- 64) Yamaguchi T, Gi M, Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp Toxicol Pathol.* 2017; 69, 1-7.
- 65) Ishii N, Gi M, Fujioka M, Yamano S, Okumura M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid exerts promotion effects on hepatobiliary carcinogenesis in a rat medium-term multiorgan carcinogenicity bioassay. *J Toxicol Pathol.* 2017; 30, 39-45.
- 66) Kakehashi A, Stefanov VE, Ishii N, Okuno T, Fujii H, Kawai K, Kawada N, Wanibuchi H. Proteome Characteristics of Non-Alcoholic Steatohepatitis Liver Tissue and Associated Hepatocellular Carcinomas. *Int J Mol Sci.* 2017; 18.
- 67) Doi K, Fujioka M, Sokuza Y, Ohnishi M, Gi M, Takeshita M, Kumada K, Kakehashi A, Wanibuchi H. Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis. *In Vivo.* 31, 2017; 187-197.
- 68) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Doi K, Okuno T, Kakehashi A, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 104 weeks. *J Toxicol Sci.* 2017; 42, 475-483.
- 69) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Fukushima S, Wanibuchi H. Progression of Hepatic Adenoma to Carcinoma in *Ogg1* Mutant Mice Induced by Phenobarbital. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 8541064.
- 70) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. Enhanced Susceptibility of *Ogg1* Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 18, 2017; pii: E1801.
- 71) Fuji S, Suzuki S, Naiki-Ito A, Kato H, Hayakawa M, Yamashita Y, Kuno T, Takahashi S. The NADPH oxidase inhibitor apocynin suppresses preneoplastic liver foci of rats. *Toxicol Pathol.* 2017; 45: 544-50.
- 72) Akagi J, Yokoi M, Cho YM, Toyoda T, Ohmori H, Hanaoka F, Ogawa K. Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases η , ι and κ to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening. *DNA Repair.* 2017; 61: 76-85.
- 73) Takeshima H, Niwa T, Toyoda T, Wakabayashi M, Yamashita S, Ushijima T. The degree of methylation burden is determined by the exposure period to carcinogenic factors. *Cancer Sci.* 2017; 108: 316-21.
- 74) Kanie S, Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Yoshida S, Hashimoto N, Imaida K. Suppressive effects of the expectorant drug ambroxol hydrochloride on quartz-induced lung inflammation in F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.* 2017; 30(2): 153-159.
- 75) 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.
- 76) Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y. Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin. *Genes Environ.* 2017; 39: 12.
- 77) Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis.* 2017; 32: 455-462.

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 σ -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 γ -H2AX formation in the rat urinary bladder induced by aromatic amines with structures similar to that of σ -toluidine. 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Anaheim (2020 年 3 月)
- 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 γ -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 γ -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)
- 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 γ -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管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) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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- σ -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)
- 22) 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)
- 23) 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)
- 24) 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)
- 25) 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)
- 26) 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)
- 27) 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)
 - 28) 魏民、藤岡正喜、行松直、奥野高裕、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機. BBN誘発マウス膀胱がんモデルにおけるAcetazolamideの予防効果の検討. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019年2月)
 - 29) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、多胡善幸、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. NASHモデルTSODマウスにおける肝臓腫瘍および肝臓組織のメタボローム解析. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019年2月)
 - 30) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物Dimethylarsinic acidの経胎盤ばく露によるマウス肺発がん過程におけるヒストン修飾異常. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019年2月)
 - 31) 奥野高裕、行松直、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性膀胱癌に関わるヒト膀胱癌の特徴と実験病理学的解析. 第18回分子予防環境医学研究会大会、愛知県 (2019年1月)
 - 32) 行松直、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. o-Acetoacetotoluidideによる膀胱に対する毒性、発がんプロモーション作用の検討. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019年1月)
 - 33) 山口貴嗣、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸のF344ラットにおける慢性毒性試験及び発がん性試験. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019年1月)
 - 34) 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 γ -H2AX形成. 第78回日本癌学会学術総会、京都 (2019年9月)
 - 35) 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. γ -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)
 - 36) 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)
 - 37) 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*-クレジジンの遺伝毒性をFFPE-RNA-Seqで評価. ACEM/JEMS 2019、東京 (2019年11月)
 - 38) 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)
 - 39) 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 γ -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)
 - 40) 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 α -ナフトフラボン併用投与による腫瘍形成におけるPol κ 欠損の影響. 第78回日本癌学会学術総会、京都 (2019年9月)
 - 41) 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)
 - 42) 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)
 - 43) 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)
 - 44) 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)
 - 45) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Ide T, Toyoda T, Ogawa K. Effects of antioxidant and inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. IUTOX 15th International Congress of Toxicology, Honolulu (2019.7)
 - 46) 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)
 - 47) 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)
 - 48) 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)
 - 49) 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 γ -H2AX形成及び膀胱がん幹細胞マーカー発現の経時的変化. 第46回日本毒性学会学術年会、徳島 (2019

- 年 6 月)
- 50) 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-メントキン) 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)
 - 51) 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)
 - 52) 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)
 - 53) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、中村義一、齋島由二. RNA アプタマーを利用した機能性医療材料開発. 日本薬学会第 139 年会、千葉 (2019 年 3 月)
 - 54) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Effects of N-acetyl-L-cysteine on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore (2019 年 3 月)
 - 55) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子. 膀胱発がん物質投与初期における遺伝子発現解析および新規膀胱発がんマーカーの探索. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 2 月)
 - 56) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 1,3-Dichloro-2-propanol の F344 ラットを用いた 28 日間反復強制経口投与による毒性プロファイルの検索. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 2 月)
 - 57) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子. 膀胱発がん物質投与による γ -H2AX 形成の用量相関性及び経時的変化. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 2 月)
 - 58) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子. C57BL/6J 野生型および Pol κ 欠損マウスにおけるベンゾ[a]ピレンおよび α -ナフトフラボン併用投与の効果. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 1 月)
 - 59) 曹永晩、水田保子、赤木純一、豊田武士、井手鉄哉、小川久美子. 腹腔内投与銀ナノ粒子による BALB/c マウスの急性毒性における抗酸化剤の影響. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 1 月)
 - 60) 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)
 - 61) 鈴木周五、加藤寛之、不二哲、内木綾、高橋智、ラット膀胱発がんに対するニコチンの影響. 第 35 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京 (2019 年 1 月)
 - 62) 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)
 - 63) 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)
 - 64) Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS、東京 (2019 年 11 月)
 - 65) 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)
 - 66) 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)
 - 67) Totsuka Y. How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting, リヨン (2019 年 7 月)
 - 68) 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)
 - 69) Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using Comprehensive DNA Adduct Analysis (DNA Adductome Analysis) 2nd Hebei International Forum on Theory and Oractice of Cancer Prevention and Control、石家庄 (2019 年 7 月)
 - 70) 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)
 - 71) 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)
 - 72) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 日本毒性学会生体金属部会主催メタルバイオサイエンス研究会 2018、宮城 (2018 年 11 月)
 - 73) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid のマウス経胎盤ばく露による発がん機序の検討. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
 - 74) 奥野高裕、行松直、藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐

- 淵英機. Acetoaceto-o-toluidide はラット膀胱上皮細胞の増殖と DNA 傷害を誘発する. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 75) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、藤岡正喜、多胡善幸、魏民、鰐淵英機. メタボリックシンドロームモデル TSOD マウスにおける NASH 肝臓組織及び腫瘍のメタボローム解析. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 76) 魏民、藤岡正喜、奥野高裕、行松直、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける 1,4-dioxane の変異原性と発がん性の定量的解析. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 77) 鰐淵英機、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕. 環境化学物質による発がん細胞傷害・修復の破綻. 第 107 回日本病理学会総会、北海道 (2018 年 6 月) (ワークショップ)
- 78) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、魏民、鰐淵英機. 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の肝細胞と肝がんにおけるプロテオーム解析. 第 107 回日本病理学会総会、北海道 (2018 年 6 月)
- 79) 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、魏民、鰐淵英機. NASH 由来の肝細胞癌における mTOR の活性化. 第 107 回日本病理学会総会、北海道 (2018 年 6 月)
- 80) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、鰐淵英機. 職業性胆管がんにおける疫学および動物モデルでの知見. 第 25 回日本がん予防学会学術総会、香川 (2018 年 6 月)
- 81) 行松直、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性の検討. 第 33 回発癌病理研究会、静岡 (2018 年 8 月)
- 82) 熊田賢次、藤岡正喜、魏民、大石裕司、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 第 17 回分子予防環境医学研究会、三重 (2018 年 2 月)
- 83) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の開発. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 84) 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 2 つの NASH モデルマウスにおける病理組織学的所見の違い. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 85) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 86) 梯アンナ、奥野高裕、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. NASH の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 87) 熊田賢次、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. O-Acetoacetotoluidide (AAOT) の毒性影響の検討. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 88) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Metabolomics and DNA adductome analysis of urinary bladder carcinogen o-toluidine. The 23rd Shizuoka Forum on Health and Longevity, Shizuoka (2018 年 11 月)
- 89) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Metabolomics and DNA adductome analysis of urinary bladder carcinogen o-toluidine. The 4th International Conference on Pharma-food General Information, Shizuoka (2018 年 11 月)
- 90) Akagi J, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Yokoi M, Hanaoka F, Ohmori H, Ogawa K. Benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis in Pol κ -knockout mice. 3R&3C Symposium, Kanazawa (2018 年 11 月)
- 91) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、中村義一、齋島由二. RNA アプタマーを用いた新規骨再生用材料の *in vivo* 性能評価. 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会、神戸 (2018 年 11 月)
- 92) 野村幸世、豊田武士、菅原寧彦. 胃癌バイオマーカーとしての血清 TFF3 の起源とその上昇機序の解明. 第 22 回日本肝臓学会大会、神戸 (2018 年 11 月)
- 93) 田島悠也、豊田武士、平山裕一郎、橋詰力、松下幸平、小川久美子、渡辺賢二、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. 膀胱発がん性芳香族アミン o-toluidine の代謝物分析と DNA 付加体. 日本環境変異原学会第 47 回大会、京都 (2018 年 11 月)
- 94) 降旗千恵、豊田武士、小川久美子、鈴木孝昌. RNA-Seq による 1,4-ジオキサン (DO) のラット肝臓における遺伝子発現プロファイル: 遺伝毒性および非遺伝毒性肝発がん物質との比較. 日本環境変異原学会第 47 回大会、京都 (2018 年 11 月)
- 95) 豊田武士、山田貴宣、三好規之、小川久美子. 芳香族アミン誘発ラット膀胱発がん過程の初期段階における遺伝子発現動態. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 96) 山田貴宣、豊田武士、小川久美子. 幹細胞マーカー免疫染色による膀胱発がん物質の早期検出. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 97) 保田智彦、吉田寛、内田英二、豊田武士、瀬戸泰之、野村幸世. MEK 阻害剤によるヘリコバクター・ピロリ菌感染スナネズミ胃粘膜の回復. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 98) 保田智彦、Qing Yang、豊田武士、Eunyoung Choi、内田英二、吉田寛、瀬戸泰之、James R. Goldenring、野村幸世. MEK 阻害剤 Selumetinib による *H. pylori* 感染スナネズミ胃粘膜における化生粘膜の回復. 第 27 回消化器疾患病態治療研究会、高知 (2018 年 9 月)
- 99) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Tamehiro N, Kimura Y, Adachi R, Ogawa K. Dose-dependent

- sensitization effects of transcutaneously exposed acid-hydrolyzed wheat protein. 16th European Congress of Toxicologic Pathology, Brussels (2018年9月)
- 100) 豊田武士、山田貴宣、鈴木周五、松下幸平、曹永晩、赤木純一、森川朋美、水田保子、西川秋佳、小川久美子. γ -H2AX を指標とした化学物質の膀胱発がん性早期検出系の開発. 第33回発癌病理研究会、御殿場 (2018年8月)
- 101) 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二. 芳香族アミン類の代謝物分析とDNA付加体. 第33回発癌病理研究会、御殿場 (2018年8月)
- 102) 豊田武士、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、小川久美子. 膀胱発がん性芳香族アミンの短期投与によるラット膀胱粘膜遺伝子発現動態への影響. 第45回日本毒性学会学術年会、大阪 (2018年7月)
- 103) 曹永晩、赤木純一、水田保子、豊田武士、小川久美子. コレラトキシン及びコレラトキシンBサブユニットの経皮曝露感作性試験におけるアジュバントとしての可能性. 第45回日本毒性学会学術年会、大阪 (2018年7月)
- 104) 山田貴宣、豊田武士、曾根瑞季、鈴木周五、松下幸平、森川朋美、小川久美子. γ -H2AX を指標とした膀胱発がん性の早期予測—追加の化学物質による検証—. 第45回日本毒性学会学術年会、大阪 (2018年7月)
- 105) 豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、三好規之、若林敬二、小川久美子. 膀胱がんリスク因子としてのノルハルマン代謝物：ラットを用いた検討. がん予防学術大会2018高松、高松 (2018年6月)
- 106) Nomura S, Yasuda T, Yang Q, Toyoda T, Choi E, Uchida E, Seto Y, Goldenring JR. Amelioration of metaplasia and re-emergence of normal gastric lineages after treatment of *H. pylori* infected gerbils with a MEK inhibitor. Digestive Disease Week 2018, Washington (2018年6月)
- 107) 森川朋美、松下幸平、豊田武士、山田貴宣、高橋美和、井上薫、小川久美子. ラットを用いた2-エチルブタナールの90日間亜慢性反復経口投与毒性試験. 日本食品化学学会第24回総会・学術大会、東京 (2018年5月)
- 108) 野村幸世、豊田武士、大津洋、石橋祐子、愛甲丞、長田梨比人、市田晃彦、菅原寧彦、國土典弘、瀬戸泰之. 胃癌、膵癌、乳癌早期発見バイオマーカーとしての血清TFF3とその起源の解明. 第118回日本外科学会定期学術集会、東京 (2018年4月)
- 109) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、横井雅幸、大森治夫、花岡文雄、小川久美子. ベンゾ[a]ピレン誘発発がんに対するPol κ の寄与の解析. 日本薬学会第138年会、金沢 (2018年3月)
- 110) Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. γ -H2AX formation induced by the bladder-carcinogenic aromatic amines *o*-toluidine and *o*-anisidine in the urinary bladder of rats. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio (2018年3月)
- 111) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Adjuvant effects of transcutaneously exposed cholera toxin and its B sub-unit. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio (2018年3月)
- 112) 豊田武士、松下幸平、曹永晩、赤木純一、曾根瑞季、西川秋佳、小川久美子. γ -H2AX免疫染色による膀胱発がんリスク早期検出法の開発. 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇 (2018年1月)
- 113) 曹永晩、水田保子、赤木純一、豊田武士、小川久美子. 経皮曝露感作性試験におけるコレラトキシン及びコレラトキシンBサブユニットのアジュバント作用. 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇 (2018年1月)
- 114) 山田貴宣、松下幸平、豊田武士、森川朋美、高橋美和、井上薫、小川久美子. ラットを用いたバニリンプロピレングリコールアセタール(バニリンPGA)の90日間亜慢性反復経口投与毒性試験. 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇 (2018年1月)
- 115) 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ニコチンの影響. 第77回日本癌学会学術総会、大阪 (2018年9月)
- 116) 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ニコチンの影響. 第107回日本病理学会総会、札幌 (2018年6月)
- 117) 鈴木周五、内木綾、加藤寛之、高橋智、前立腺発がん物質の早期検出モデルの確立. 第34回日本毒性病理学会総会および学術集会、沖縄 (2018年1月)
- 118) 戸塚ゆ加里、佐藤春菜、松田知成、加藤護、アスマ・エルザワハリ、遠藤治. 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする. 第47回日本環境変異原学会、京都 (2018年11月)
- 119) 佐藤春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築. 第47回日本環境変異原学会、京都 (2018年11月)
- 120) 前迫侑也、椎崎一宏、高村岳樹、戸塚ゆ加里. 職業性胆管がん発生に関与する1,2-ジクロロプロパンのDNA付加体の網羅的な解析(アダクトーム解析). 第47回日本環境変異原学会、京都 (2018年11月)
- 121) 神尾翔真、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里. ナノマテリアルの表面修飾が及ぼす遺伝毒性への影響. 第47回日本環境変異原学会、京都 (2018年11月)
- 122) 斎藤春吾、渡邊昌俊、戸塚ゆ加里. ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立. 第47回日本環境変異原学会、京都 (2018年11月)

- 123) 石野孔祐、前迫侑也、内藤善哉、戸塚ゆ加里。質量分析データに基づく DNA 付加体データベースの整備。第 47 回日本環境変異原学会、京都 (2018 年 11 月)
- 124) 戸塚ゆ加里、秋場望、佐藤春菜、前迫有也、松田知成、加藤護、アスマ・エルザワハリ、十時泰、柴田龍弘、中釜齊。全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする。第 33 回発がん病理研究会、御殿場 (2018 年 8 月)
- 125) Totsuka Y, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Nakagama H. Whole genome sequencing analysis elucidates the interaction between environmental factors and causes of human cancer. 第 77 回日本癌学会総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 126) 斎藤春五、高橋沙奈衣、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊。ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立。第 77 回日本癌学会総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 127) 高橋沙奈衣、斎藤春五、新田見匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊。Fe³O₄ ナノ粒子の曝露された癌細胞における microRNAs のプロファイリングについて (II)。第 77 回日本癌学会総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 128) 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二。芳香族アミン類の代謝物分析と DNA 付加体。第 33 回発がん病理研究会、御殿場 (2018 年 8 月)
- 129) Totsuka Y. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics, コルカタ (2018 年 1 月)
- 130) 岡部麻子、桐山諭和、鈴木周五、櫻井浩平、高橋智、塚本徹哉、DNA 二重鎖切断マーカー γ -H2AX を用いた胃発がん物質の短期同定、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)
- 131) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、ファインチューニングした Deep Convolutional Neural Networks によるヒト肺癌細胞像の自動分類。第 107 回日本病理学会総会、札幌 (2018 年 6 月)
- 132) 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)
- 133) 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)
- 134) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機。マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序。第 23 回ヒ素シンポジウム、茨城 (2017 年 12 月)
- 135) 鰐淵英機。芳香族アミンによる膀胱癌の臨床病理学的研究と AAOT の毒性、発がん性評価。第 45 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、山形 (2017 年 10 月)
- 136) 香山侑弘、魏民、藤岡正喜、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機。BBN 誘発マウス膀胱がんにおける Ink4a/Arf の役割の検討。第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 137) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、香山侑弘、熊田賢次、鰐淵英機。BBN 誘発マウス膀胱発がんモデルにおける Acetazolamide の抑制効果の検討。第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 138) 藤岡正喜、魏民、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機。CD1 マウスにおけるジメチルアルシン酸 (DMA) の胎児期ばく露による発がん性。第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 139) 梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機。非アルコール性脂肪肝炎の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析。第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 140) 奥野高裕、梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機。NASH モデルマウスを用いた肝細胞癌の発がんメカニズム解析。第 32 回発癌病理研究会、滋賀 (2017 年 8 月)
- 141) 鰐淵英機。実験的アプローチを用いたヒ素発がん性の証明とその機序の解明。第 106 回日本病理学会総会、東京 (2017 年 4 月)
- 142) 鰐淵英機、魏民、藤岡正喜、梯アンナ。ヒ素の発がんリスク評価。第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2017 年 7 月)
- 143) 藤岡正喜、魏民、河内聡子、梯アンナ、鰐淵英機。1,2-ジクロロプロパンおよびジクロロメタン複合曝露によるマウス肝臓への影響。第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2017 年 7 月)
- 144) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子。ベンゾ[a]ピレン混餌投与によるマウス前胃腫瘍発生に対する Pol κ の寄与。第 40 回日本分子生物学会年会、神戸 (2017 年 12 月)
- 145) Tajima Y, Toyoda T, Matsushita K, Hashidume T, Wakabayashi K, Miyoshi N. Analysis of genotoxic activities of urinary bladder carcinogenic aromatic amines. 12th International Conference on Environmental Mutagens, Incheon (2017 年 11 月)
- 146) 降旗千恵、鈴木孝昌、豊田武士、小川久美子。次世代シーケンス-Targeted mRNA Sequencing によるトキシコゲノミクス指標遺伝子の検証。日本環境変異原学会第 46 回大会、東京 (2017 年 11 月)
- 147) 小川久美子、曹永晩、石井雄二、豊田武士。病理からみた遺伝毒性。日本環境変異原学会第 46 回大会、東京 (2017 年 11 月)
- 148) 豊田武士、三好規之、小川久美子。o-トルイジンおよび o-アニシジンはラット膀胱粘膜に γ H2AX 形成を誘導する。第 76 回日本癌学会学術総会、横浜 (2017 年 9 月)

- 149) 豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子. 芳香族アミン投与ラット膀胱粘膜における γ H2AX発現. 第44回日本毒性学会学術年会、横浜(2017年7月)
- 150) 曹永晚、赤木純一、水田保子、豊田武士、小川久美子. サイズによって異なるナノ銀の急性毒性. 第44回日本毒性学会学術年会、横浜(2017年7月)
- 151) 野村幸世、豊田武士、長田梨比人、市田晃彦、大津洋、石橋祐子、愛甲丞、菅原寧彦、國土典弘、瀬戸泰之. 胃癌、膵癌早期発見バイオマーカーとしての血清 TFF3 の起源とその上昇機序の解明. 第26回日本癌病態治療研究会、横浜(2017年6月)
- 152) 竹島秀幸、丹羽透、豊田武士、山下聡、牛島俊和. 組織におけるエピゲノム傷害の程度は、発がん要因への曝露期間により決まる. 第11回日本エピジェネティクス研究会年会、東京(2017年5月)
- 153) 鈴木周五、加藤寛之、不二哲、内木綾、山下依子、久野壽也、高橋智、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第76回日本癌学会学術総会、横浜(2017年9月)
- 154) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、山下依子、久野壽也、高橋智、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第106回日本病理学会総会、東京(2017年4月)
- 155) 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築. 第46回日本環境変異原学会、東京(2017年11月)
- 156) Totsuka Y. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017, つくば(2017年12月)
- 157) 前迫裕也、善家茜、アスマ・エルザワハリ、古川英作、加藤護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚ゆ加里. 次世代シーケンサーとDNAアダクトーム解析の統合による発がん要因の探索. 第46回日本環境変異原学会、東京(2017年11月)
- 158) 秋場望、佐藤春菜、松田知成、遠藤治、稲葉一穂、戸塚ゆ加里. モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析. 第46回日本環境変異原学会、東京(2017年11月)
- 159) 神尾翔真、斎藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里. 生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立. 第46回日本環境変異原学会、東京(2017年11月)
- 160) Totsuka Y. Adductomics IWGT 2017、東京(2017年11月)
- 161) Totsuka Y., Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H. Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis ^{12th}ICEM-^{5th}ACEM, 仁川(2017年11月)
- 162) Totsuka Y., Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H. Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS, ノースカロライナ(2017年9月)
- 163) Totsuka Y. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 第76回日本癌学会学術総会、横浜(2017年9月)
- 164) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆. マウス正常上皮の3次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系. 第76回日本癌学会学術総会、横浜(2017年9月)
- 165) 戸塚ゆ加里. DNA付加体形成と突然変異誘発. 第44回日本毒性学会、横浜(2017年7月)

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）
総合分担研究報告書

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

齧歯類を用いた長期がん原性試験の代替法が求められる中で、我々はDNA損傷マーカーとして知られる γ -H2AXの免疫染色による、膀胱発がん物質の早期検出法開発を目指している。これまでに膀胱発がん物質35種、非膀胱発がん物質30種の計65物質について、F344ラットへの28日間経口投与後の膀胱粘膜における γ -H2AX形成の定量解析を実施した。その結果、 γ -H2AX陽性率を指標とした膀胱発がん性の検出感度は82.9% (29/35)、特異度は100% (30/30)であり、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。この結果を受けて、化学物質の膀胱発がん性早期検出を目的とした「膀胱における γ -H2AX免疫染色」を、28日間反復経口投与毒性試験に対する既存のOECDテストガイドライン(TG 407)に、オプションとして追加する改定案を提出した。OECD加盟国・機関からのレビューコメント(用量相関性への懸念)への対応として、2種の膀胱発がん物質(BBNおよびメラミン)について複数用量による検討を行った結果、膀胱粘膜における γ -H2AX形成は明瞭な用量相関性を示すことを確認した。本手法は化学物質の安全性評価において広く実施されている、既存の28日間反復投与試験への組み込みが容易であり、化学物質の効率的かつ迅速なリスク評価法として有用と考えられる。

A. 研究目的

齧歯類を用いた長期がん原性試験の代替法が求められる中で、我々は免疫組織化学的バイオマーカーを用いた、膀胱発がん物質の早期検出法開発を目指している。これまでに我々は、DNA損傷マーカーである γ -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。本試験系は化学物質の安全性評価において広く実施されている28日間反復経口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。

B. 研究方法

これまでに、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、遺伝毒性・非膀胱発がん物質16種、非遺伝毒性・非膀胱発がん物質6種、遺伝毒性・非発がん物質4種、非遺伝毒性・非発がん物質4種の、計65物質について検討した。6週齢、雄または雌のF344ラット(日本チャールス・リバー)に、各物質を4週間経口投与した。各被験物質の投与濃度および経路は、報告されている発がん用量または4週間の最大耐量に基づき設定した。

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(吉見班:H26-化学-指定-001)で作成した多施設での共通臓器処理マニユア

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 γ -H2AX形成および細胞増殖マーカーであるKi67の定量解析を実施した。膀胱粘膜上皮における γ -H2AXおよびKi67陽性細胞数をカウントし、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

計65物質について、膀胱粘膜上皮細胞における γ -H2AX形成を免疫組織化学的に検索した。上皮細胞1000個あたりの γ -H2AX陽性率を算出した結果、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、 γ -H2AX陽性率の有意な増加が認められた(図1)。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、 γ -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)。

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日目の時点では、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 γ -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3, 4)。メ

ラミン投与群では、 γ -H2AX・Ki67 陽性率は2日・4週時点でもとも最高用量の3%群でのみ有意に増加した(図5, 6)。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。

γ -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 γ -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、 γ -H2AX 単独陽性細胞も多く認められた(図7)。

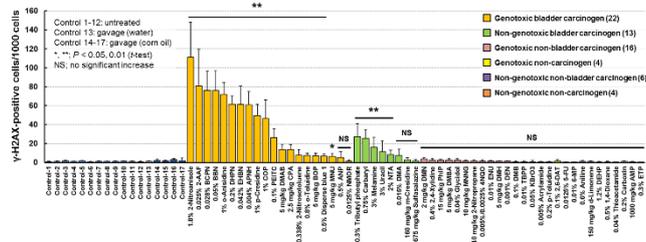


図1. ラット膀胱粘膜上皮細胞における γ -H2AX 陽性率の解析結果(国立衛研担当分)。

		ラット膀胱に対する発がん性	
		+	-
膀胱上皮における γ -H2AX 形成	+	29	0
	-	6	30

感度 = 82.9% (29/35)、特異度 = 100% (30/30)

図2. 膀胱上皮における γ -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。

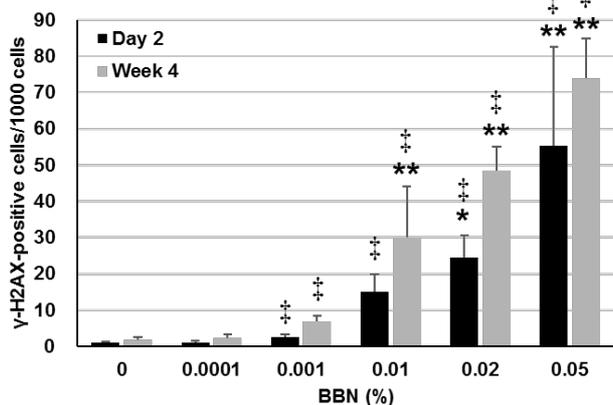


図3. BBN 投与ラット膀胱粘膜上皮における γ -H2AX 陽性率。*; $P < 0.05$ (Dunnett 多群検定), †; $P < 0.01$ (Jonckheere 傾向検定)。

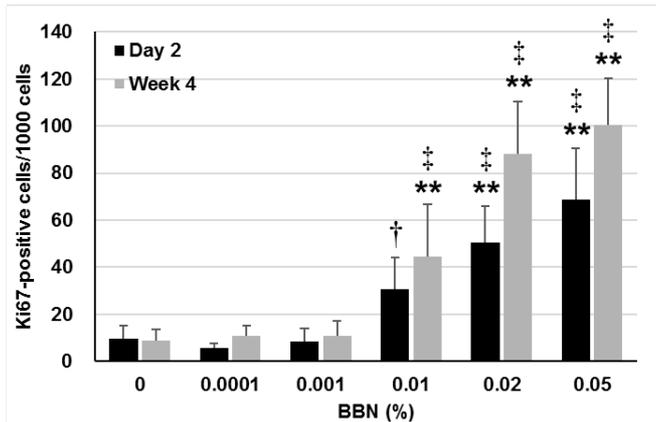


図4. BBN 投与ラット膀胱粘膜上皮におけるKi67 陽性率。*; $P < 0.01$ (Dunnett 多群検定), †, ‡; $P < 0.05, 0.01$ (Jonckheere 傾向検定)。

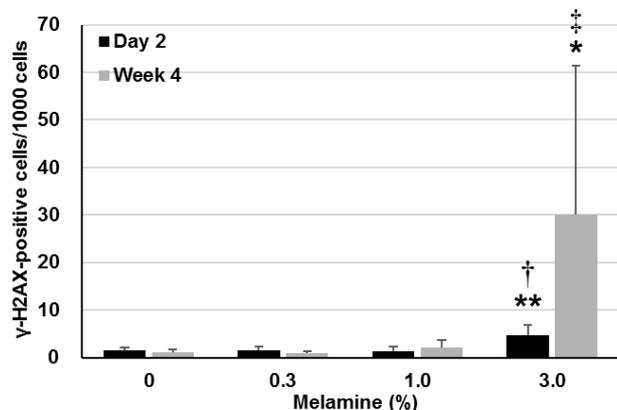


図5. メラミン投与ラット膀胱粘膜上皮における γ -H2AX 陽性率。*, **; $P < 0.05, 0.01$ (Dunnett 多群検定), †, ‡; $P < 0.05, 0.01$ (Jonckheere 傾向検定)。

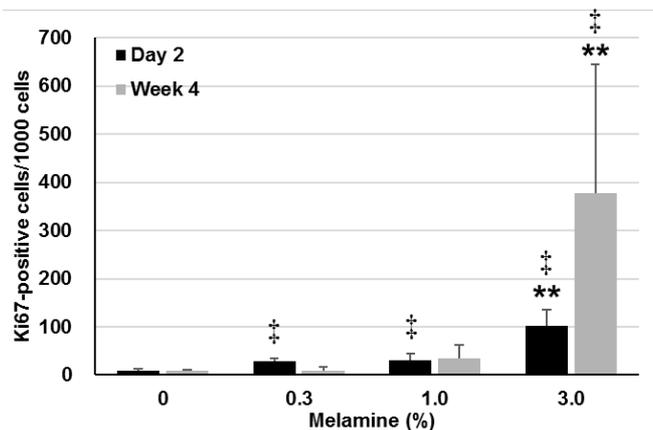


図6. メラミン投与ラット膀胱粘膜上皮におけるKi67 陽性率。*; $P < 0.01$ (Dunnett 多群検定), †; $P < 0.01$ (Jonckheere 傾向検定)。

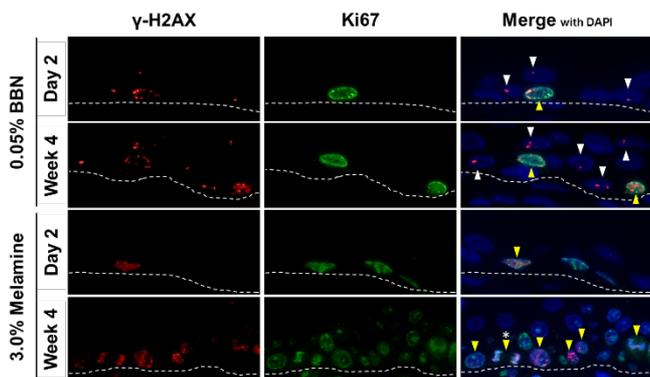


図 7. BBN およびメラミン投与ラット膀胱粘膜における γ -H2AX/Ki67 免疫蛍光染色。 γ -H2AX 単独陽性細胞（白矢頭）、 γ -H2AX/Ki67 共発現細胞（黄矢頭）。

OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME	
Standard Project Submission Form	
If you require further information please contact the OECD Secretariat Return completed forms to: Anne Gourmelon (anne.gourmelon@oecd.org) and Christina Quaglio (christina.quaglio@oecd.org)	
PROJECT TITLE	
Update of the repeated dose oral toxicity 28-day study (OECD TG 407) with optional inclusion of immunohistochemistry for γ -H2AX in the urinary bladder	
SUBMITTED BY (Country / European Commission / Secretariat)	
Japan	
DATE OF SUBMISSION TO THE SECRETARIAT	
31 October 2018	
DETAILS OF LEAD COUNTRY/CONSORTIUM	
Country /Organisation:	Japan
Agency/ministry/Other:	National Institute of Health Sciences, NIHS / Ministry of Health, Labour and Welfare, MHLW
Mail Address:	NIHS: 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan/ MHLW: 1-2-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8916, Japan
Phone/fax:	NIHS: (phone) +81-44-270-6651, (fax) +81-44-270-6655/ MHLW: (phone) +81-3-3595-2298
Email:	NIHS: t-toyoda@nihs.go.jp MHLW: tsukano-masaaki12@mhlw.go.jp

図 8. 既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に、 γ -H2AX 免疫染色による膀胱発がん性早期検出法の追加を提案する SPSF (表紙)。

D. 考察

これまでの検討結果から、 γ -H2AX 免疫染色によって化学物質のラット膀胱に対する発がん性を、感度 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。この結果を受けて、「膀胱における γ -H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与毒性試験に対する既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に追加する改定案 (Standard Project Submission Form; SPSF) を、平成 30 年 11 月に厚生労働省を通じて提出した (図 8)。

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 γ -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。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 γ -H2AX 形成の用量相関性が不明であることへの対応として、非発がん物質を中心に新たに 5 物質の追加検討を行った。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、 γ -H2AX 形成が明瞭な用量相関性を示すことを確認した。

用量相関性を検討した実験では、BBN 投与群の膀胱における γ -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、 γ -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 γ -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 γ -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、 γ -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 γ -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 γ -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、 γ -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 γ -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.
 - 5) Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with *o*-toluidine and *o*-anisidine. *Arch Toxicol.* 2019; 93: 753-62.
 - 6) 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.
 - 7) Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of acetaminophen using an obese rat model. *J Toxicol Sci.* 2018; 43: 423-33.
 - 8) Sone M, Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Morikawa T, Nishikawa A, Ogawa K. Immunohistochemistry of γ -H2AX as a method of early detection of urinary bladder carcinogenicity in mice. *J Appl Toxicol.* 2019; 39: 868-76.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) Tanoue Y, Toyoda T, Sun J, Mustofa MK, Tateishi C, Endo S, Motoyama N, Araki K, Wu D, Okuno Y, Tsukamoto T, Takeya M, Ihn H, Vaziri C, Tateishi S. Differential roles of Rad18 and Chk2 in genome maintenance and skin carcinogenesis following UV exposure. *J Invest Dermatol.* 2018; 138: 2550-7.
 - 13) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Takahashi M, Inoue K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-ethylbutanal in F344 rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018; 100: 118-26.
 - 14) Akagi J, Cho YM, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Subchronic toxicity evaluation of 5-hexenyl isothiocyanate, a nature identical flavoring substance from *Wasabia japonica*, in F344/DuCrj rats. *Food Chem Toxicol.* 2018; 122: 80-6.
 - 15) Furihata C, Toyoda T, Ogawa K, Suzuki T. Using RNA-Seq with 11 marker genes to evaluate 1,4-dioxane compared with typical genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens. *Mutat Res.* 2018; 834: 51-5.
 - 16) Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from *o*-toluidine and aniline. *J Appl Toxicol.* 2018; 38: 537-43.
 - 17) Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Sone M, Ogawa K. Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol.* 2018; 31: 73-80.
 - 18) Hirata T, Cho YM, Suzuki I, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate mediates nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 activation by regulating reactive oxygen species production in human esophageal epithelial cells. *Food Chem Toxicol.* 2018; 111: 295-301.
 - 19) Akagi J, Yokoi M, Cho YM, Toyoda T, Ohmori H, Hanaoka F, Ogawa K. Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases η , ι and κ to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening. *DNA Repair.* 2017; 61: 76-85.
 - 20) Takeshima H, Niwa T, Toyoda T, Wakabayashi M, Yamashita S, Ushijima T. The degree of methylation burden is determined by the exposure period to carcinogenic factors. *Cancer Sci.* 2017; 108: 316-21.
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)
 - 2) Toyoda T, Yamada T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Mucosal damage and γ -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、曹永晚、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 γ -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 γ -H2AX形成. 第78回日本癌学会学術総会、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. γ -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 γ -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 γ -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 γ -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 α -ナフトフラボン併用投与による腫瘍形成における Pol κ 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 (2019.9)
 - 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 (2019.7)
 - 21) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Ide T, Toyoda T, Ogawa K. Effects of antioxidant and inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. IUTOX 15th International Congress of Toxicology, Honolulu (2019.7)
 - 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 γ -H2AX形成及び膀胱がん幹細胞マーカー発現の経時的変化. 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)
- 29) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、中村義一、齋島由二. RNA アプタマーを利用した機能性医療材料開発. 日本薬学会第 139 年会、千葉 (2019 年 3 月)
- 30) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Effects of N-acetyl-L-cysteine on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore (2019 年 3 月)
- 31) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子. 膀胱発がん物質投与初期における遺伝子発現解析および新規膀胱発がんマーカーの探索. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 2 月)
- 32) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 1,3-Dichloro-2-propanol の F344 ラットを用いた 28 日間反復強制経口投与による毒性プロファイルの検索. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 2 月)
- 33) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子. 膀胱発がん物質投与による γ -H2AX 形成の用量相関性及び経時的変化. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 2 月)
- 34) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子. C57BL/6J 野生型および Pol κ 欠損マウスにおけるベンゾ[a]ピレンおよび α -ナフトフラボン併用投与の効果. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 1 月)
- 35) 曹永晩、水田保子、赤木純一、豊田武士、井手鉄哉、小川久美子. 腹腔内投与銀ナノ粒子による BALB/c マウスの急性毒性における抗酸化剤の影響. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 1 月)
- 36) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Metabolomics and DNA adductome analysis of urinary bladder carcinogen *o*-toluidine. The 23rd Shizuoka Forum on Health and Longevity, Shizuoka (2018 年 11 月)
- 37) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Metabolomics and DNA adductome analysis of urinary bladder carcinogen *o*-toluidine. The 4th International Conference on Pharma-food General Information, Shizuoka (2018 年 11 月)
- 38) Akagi J, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Yokoi M, Hanaoka F, Ohmori H, Ogawa K. Benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis in Pol κ -knockout mice. 3R&3C Symposium, Kanazawa (2018 年 11 月)
- 39) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、中村義一、齋島由二. RNA アプタマーを用いた新規骨再生用材料の *in vivo* 性能評価. 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会、神戸 (2018 年 11 月)
- 40) 野村幸世、豊田武士、菅原寧彦. 胃癌バイオマーカーとしての血清 TFF3 の起源とその上昇機序の解明. 第 22 回日本肝臓学会大会、神戸 (2018 年 11 月)
- 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、戸塚ゆかり、若林敬二、三好規之. 膀胱発がん性芳香族アミン *o*-toluidine の代謝物分析と DNA 付加体. 日本環境変異原学会第 47 回大会、京都 (2018 年 11 月)
- 42) 降旗千恵、豊田武士、小川久美子、鈴木孝昌. RNA-Seq による 1,4-ジオキサン (DO) のラット肝臓における遺伝子発現プロファイル: 遺伝毒性および非遺伝毒性肝発がん物質との比較. 日本環境変異原学会第 47 回大会、京都 (2018 年 11 月)
- 43) 豊田武士、山田貴宣、三好規之、小川久美子. 芳香族アミン誘発ラット膀胱発がん過程の初期段階における遺伝子発現動態. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 44) 山田貴宣、豊田武士、小川久美子. 幹細胞マーカー免疫染色による膀胱発がん物質の早期検出. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 45) 保田智彦、吉田寛、内田英二、豊田武士、瀬戸泰之、野村幸世. MEK 阻害剤によるヘリコバクター・ピロリ菌感染スナネズミ胃粘膜の回復. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 46) 保田智彦、Qing Yang、豊田武士、Eunyoung Choi、内田英二、吉田寛、瀬戸泰之、James R. Goldenring、野村幸世. MEK 阻害剤 Selumetinib による *H. pylori* 感染スナネズミ胃粘膜における化生粘膜の回復. 第 27 回消化器疾患病態治療研究会、高知 (2018 年 9 月)
- 47) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Tamehiro N, Kimura Y, Adachi R, Ogawa K. Dose-dependent sensitization effects of transcutaneously exposed acid-hydrolyzed wheat protein. 16th European Congress of Toxicologic Pathology, Brussels (2018 年 9 月)
- 48) 豊田武士、山田貴宣、鈴木周五、松下幸平、曹永晩、赤木純一、森川朋美、水田保子、西川秋佳、小川久美子. γ -H2AX を指標とした化学物質の膀胱発がん性早期検出系の開発. 第 33 回発癌病理研究会、御殿場 (2018 年 8 月)

- 49) 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二. 芳香族アミン類の代謝物分析と DNA 付加体. 第 33 回発癌病理研究会、御殿場 (2018 年 8 月)
- 50) 豊田武士、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、小川久美子. 膀胱発がん性芳香族アミンの短期投与によるラット膀胱粘膜遺伝子発現動態への影響. 第 45 回日本毒性学会学術年会、大阪 (2018 年 7 月)
- 51) 曹永晩、赤木純一、水田保子、豊田武士、小川久美子. コレラトキシン及びコレラトキシン B サブユニットの経皮曝露感作性試験におけるアジュバントとしての可能性. 第 45 回日本毒性学会学術年会、大阪 (2018 年 7 月)
- 52) 山田貴宣、豊田武士、曾根瑞季、鈴木周五、松下幸平、森川朋美、小川久美子. γ -H2AX を指標とした膀胱発がん性の早期予測—追加の化学物質による検証—. 第 45 回日本毒性学会学術年会、大阪 (2018 年 7 月)
- 53) 豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、三好規之、若林敬二、小川久美子. 膀胱がんリスク因子としてのノルハルマン代謝物：ラットを用いた検討. がん予防学術大会 2018 高松、高松 (2018 年 6 月)
- 54) Nomura S, Yasuda T, Yang Q, Toyoda T, Choi E, Uchida E, Seto Y, Goldenring JR. Amelioration of metaplasia and re-emergence of normal gastric lineages after treatment of *H. pylori* infected gerbils with a MEK inhibitor. Digestive Disease Week 2018, Washington (2018 年 6 月)
- 55) 森川朋美、松下幸平、豊田武士、山田貴宣、高橋美和、井上薫、小川久美子. ラットを用いた 2-エチルブタナールの 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験. 日本食品化学学会第 24 回総会・学術大会、東京 (2018 年 5 月)
- 56) 野村幸世、豊田武士、大津洋、石橋祐子、愛甲丞、長田梨比人、市田晃彦、菅原寧彦、國土典弘、瀬戸泰之. 胃癌、膵癌、乳癌早期発見バイオマーカーとしての血清 TFF3 とその起源の解明. 第 118 回日本外科学会定期学術集会、東京 (2018 年 4 月)
- 57) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、横井雅幸、大森治夫、花岡文雄、小川久美子. ベンゾ[a]ピレン誘発発がんに対する Pol κ の寄与の解析. 日本薬学会第 138 年会、金沢 (2018 年 3 月)
- 58) Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. γ -H2AX formation induced by the bladder-carcinogenic aromatic amines *o*-toluidine and *o*-anisidine in the urinary bladder of rats. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio (2018 年 3 月)
- 59) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Adjuvant effects of transcutaneously exposed cholera toxin and its B sub-unit. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio (2018 年 3 月)
- 60) 豊田武士、松下幸平、曹永晩、赤木純一、曾根瑞季、西川秋佳、小川久美子. γ -H2AX 免疫染色による膀胱発がんリスク早期検出法の開発. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇 (2018 年 1 月)
- 61) 曹永晩、水田保子、赤木純一、豊田武士、小川久美子. 経皮曝露感作性試験におけるコレラトキシン及びコレラトキシン B サブユニットのアジュバント作用. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇 (2018 年 1 月)
- 62) 山田貴宣、松下幸平、豊田武士、森川朋美、高橋美和、井上薫、小川久美子. ラットを用いたバニリンプロピレングリコールアセタール(バニリンPGA)の 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇 (2018 年 1 月)
- 63) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子. ベンゾ[a]ピレン混餌投与によるマウス前胃腫瘍発生に対する Pol κ の寄与. 第 40 回日本分子生物学会年会、神戸 (2017 年 12 月)
- 64) Tajima Y, Toyoda T, Matsushita K, Hashidume T, Wakabayashi K, Miyoshi N. Analysis of genotoxic activities of urinary bladder carcinogenic aromatic amines. 12th International Conference on Environmental Mutagens, Incheon (2017 年 11 月)
- 65) 降旗千恵、鈴木孝昌、豊田武士、小川久美子. 次世代シーケンス-Targeted mRNA Sequencing によるトキシコゲノミクス指標遺伝子の検証. 日本環境変異原学会第 46 回大会、東京 (2017 年 11 月)
- 66) 小川久美子、曹永晩、石井雄二、豊田武士. 病理からみた遺伝毒性. 日本環境変異原学会第 46 回大会、東京 (2017 年 11 月)
- 67) 豊田武士、三好規之、小川久美子. *o*-トルイジンおよび *o*-アニシジンはラット膀胱粘膜に γ H2AX 形成を誘導する. 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜 (2017 年 9 月)
- 68) 豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子. 芳香族アミン投与ラット膀胱粘膜における γ H2AX 発現. 第 44 回日本毒性学会学術年会、横浜 (2017 年 7 月)
- 69) 曹永晩、赤木純一、水田保子、豊田武士、小川久美子. サイズによって異なるナノ銀の急性毒性. 第 44 回日本毒性学会学術年会、横浜 (2017 年 7 月)
- 70) 野村幸世、豊田武士、長田梨比人、市田晃彦、大津洋、石橋祐子、愛甲丞、菅原寧彦、國土典弘、瀬戸泰之. 胃癌、膵癌早期発見バイオマーカーとしての血清 TFF3 の起源とその上昇機序の解明. 第 26 回日本癌病態治療研究会、横浜 (2017 年 6 月)
- 71) 竹島秀幸、丹羽透、豊田武士、山下聡、牛島俊和. 組織におけるエピゲノム傷害の程度は、発がん要因への曝露期間により決まる. 第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会、東京 (2017 年 5 月)

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）
総合分担研究報告書

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。以前にDNA二重鎖切断マーカーである γ H2AXが、遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として利用し得る可能性を示した。 γ H2AXに関して、膀胱発がん物質、膀胱発がん促進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で γ H2AXの有意な上昇を認め、加えて発がん促進物質でも有意な上昇が存在し、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や非発がん物質では γ H2AX標識率が対照群と差がなく、検出法の膀胱発がん物質への特異性についても示された。以上の結果から、化審法で実施される28日間反復投与試験のプロトコールに基づいて採取した膀胱において、遺伝毒性の有無に関わらず膀胱への発がん性を示す物質を検出でき、膀胱発がん促進物質についても検出できる可能性を示せた。

A. 研究目的

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

以前の研究において、膀胱を標的とする発がん物質について化審法で実施される28日間反復投与試験のプロトコールに基づいて採取した膀胱について検討した結果、遺伝毒性膀胱発がん物質を投与された膀胱尿路上皮において、 γ 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。

3年間において、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、遺伝毒性膀胱発がん物質1% 1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ)、0.5% Phenacetin (PNC)を混餌投与、N-Butyl-N-(3-carboxypropyl)nitrosamine (BCPN)を飲水投与、非遺伝毒性膀胱発がん物質0.4% N-Nitrosodiphenylamine (NDPA)、2% Sodium o-phenylphenol (SOPP)、1.5% 11-Aminoundecanoic acid (AUDA)、0.75% 1-Naphtyl-N-methylcarbamate (Carbaryl)、0.3% Tributyl phosphate (TBP)、173 ppm Sodium arsenite (NaAsO₂)

を混餌投与、16 mg/kg Pioglitazone (PGZ)を強制胃内投与、膀胱発がん促進物質0.0114% nicotine hydrogen tartrate (nicotine)、0.012% cotinineを飲水投与、5% Saccharin sodium salt dihydrate (Na-Sac)を混餌投与、遺伝毒性非膀胱発がん物質0.005 (→0.0025)% 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO)を飲水投与、非遺伝毒性非膀胱発がん物質50 mg/kg Rosiglitazone (RGZ)、90 (→45) mg/kg 1-Nitropropane (1-NP)を強制胃内投与、0.3% 8-Hydroxyquinoline (8-HQ)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。全ての膀胱組織について免疫組織染色を行い、 γ H2AXの標識率を検討した。

（倫理面への配慮）

倫理面の配慮については、大阪市立大学動物実験委員会および名古屋市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得て、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。試験開始1週間後に0.005% 4NQO投与群が体重減少を来したため、2週目以降は0.0025%に濃度変更を行った。試験期間中、ADBAQ、SOPP、AUDA、Carbaryl、4NQO、1-NP、nicotine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・剖検時の体重は有意に抑制された。

膀胱組織学的検討の結果、TBP投与群全てにpapillary/nodular (PN) hyperplasiaを認めた。BCPNおよびnicotine投与群全てにsimple hyperplasiaを認め、AUDA投与群においては、5匹中2匹に、cotinine投与群では、10匹中3匹にsimple hyperplasiaを認めた。

膀胱粘膜上皮における γ H2AX標識率は、膀胱発がん物質ADBAQ、PNC、NDPA、SOPP、AUDA、BCPN、Carbaryl、TBP、NaAsO₂投与群で有意な上昇を認めた。一方、PGZ投与群のみ対照群と差がなかった。また、膀胱発がん促進物質nicotine、cotinine、Na-Sac投与群では、有意な上昇を認めた。遺伝毒性の有無に関わらず非膀胱発がん物質RGZ、1-NP、4NQO、8-HQは対照群と差がなかった。(図1~4参照)

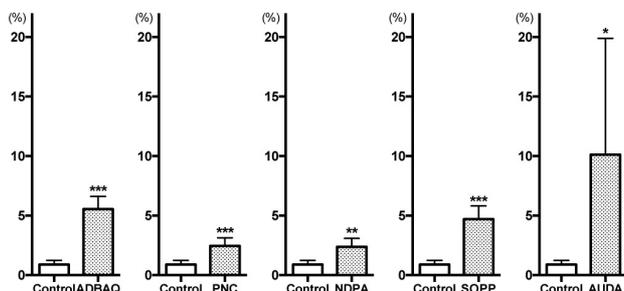


図1. 2017年度 膀胱粘膜上皮細胞における γ H2AX陽性細胞の定量解析

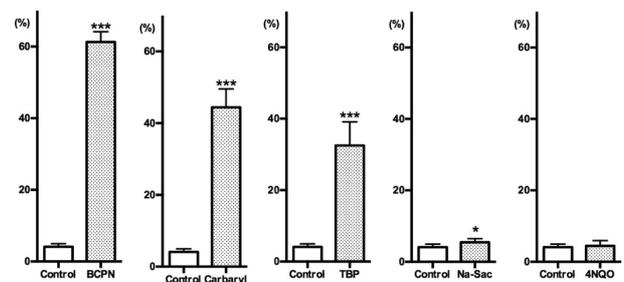


図2. 2018年度 膀胱粘膜上皮細胞における γ H2AX陽性細胞の定量解析

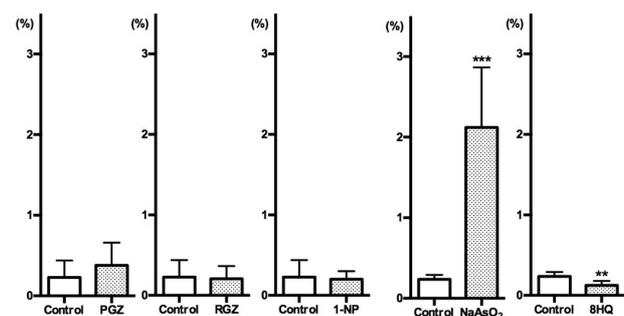


図3. 2019年度 膀胱粘膜上皮細胞における γ H2AX陽性細胞の定量解析

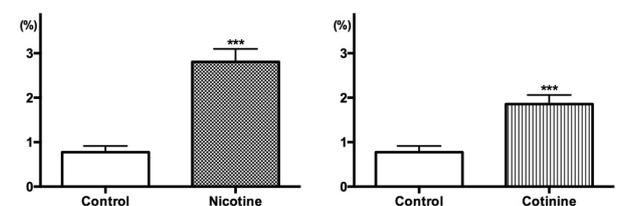


図4. NicotineおよびCotinine投与膀胱粘膜上皮細胞における γ H2AX陽性細胞の定量解析

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、PGZを除く膀胱発がん物質については、遺伝毒性の有無に関わらず検出可能であった。加えて、膀胱発がん促進物質3つについても検出できたことから、この試験法の感受性の高さを示した。一方で、膀胱発がん性を認めない化学物質4つの γ H2AX標識率はいずれも有意な上昇を示さず、 γ H2AXの膀胱発がん性に対する特異性を確認出来た。

今までの膀胱発がん物質に対する γ H2AX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5)。

		ラット膀胱に対する発がん性	
		+	-
膀胱上皮における γ -H2AX形成	+	29 2-NA, 2-AAF, BCPN, BBN, o-Anisidine, DHPN, EHN, 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)	0
	-	6 ANP, NMOR, DMA, m-Cre, SSZ, PGZ	30 DMN, 2,4-Xylidine, PhIP, DMBA, Glycidol, MNNG, 2-NP, 4NQO, ENU, DMH, DEN, DMB, TBPP, KBrO ₃ , AA, p-Toluidine, 2,6-DAT, 5-FU, 6-MP, Aniline, d-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5. γ -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。

E. 結論

化審法で実施される28日間反復投与試験において抽出した膀胱を用いた γ 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が示唆された。

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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
 - 5) Okabe A, Kiriyama Y, Suzuki S, Sakurai K, Teramoto A, Kato H, Naiki-Ito A, Tahara S, Takahashi S, Kuroda M, Sugioka A, Tsukamoto T. Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker gamma-H2AX. J Toxicol Pathol. 2019; 32: 91-9.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) Takeshita S, Yamashita Y, Shiomi K, Suzuki N, Yoshida J, Naiki-Ito A, Suzuki S, Akatsuka S, Toyokuni S, Takahashi T, Mase S, Arakawa A, Sugiura-Ogasawara M, Takahashi S. Expression of P-REX2a is associated with poor prognosis in endometrial malignancies. Oncotarget. 2018; 9: 24778-86.
 - 11) Suzuki S, Kato H, Fuji S, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Early detection of prostate carcinogens by immunohistochemistry of HMGB2. J Toxicol Sci. 2018; 43: 359-67.
 - 12) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Kato H, Fuji S, Pennington KL, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis. Toxicology. 2018; 398-399: 31-40.
 - 13) Naiki T, Naiki-Ito A, Iida K, Etani T, Kato H, Suzuki S, Yamashita Y, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis. Oncotarget. 2018; 9: 15847-59.
 - 14) Kuno T, Kato H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Tanaka T, Takahashi S, Mori H. Preventive Effects of Fermented Brown Rice and Rice Bran on Spontaneous Lymphomagenesis in AKR/NSlc Female Mice. Asian Pac J Cancer Prev. 2018; 19: 3217-23.
 - 15) Ito Y, Naiki-Ito A, Kato H, Suzuki S, Kuno T, Ishiguro Y, Takahashi S, Uemura H. Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by the down-regulation of the androgen receptor. Oncotarget. 2018; 9: 13859-69.
 - 16) Hayashi Y, Nishiyama T, Nakatochi M, Suzuki S, Takahashi S, Sugiura-Ogasawara M. Association of genetic variants of PD1 with recurrent pregnancy loss. Reprod Med Biol. 2018; 17: 195-202.
 - 17) Kataoka H, Miura Y, Kawaguchi M, Suzuki S, Okamoto Y, Ozeki K, Shimura T, Mizoshita T, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Asai K, Joh T. Expression and subcellular localization of AT motif binding factor 1 in colon tumours. Mol Med Rep. 2017; 16: 3095-102.
 - 18) Fuji S, Suzuki S, Naiki-Ito A, Kato H, Hayakawa M, Yamashita Y, Kuno T, Takahashi S. The NADPH oxidase inhibitor apocynin suppresses preneoplastic liver foci of rats. Toxicol Pathol. 2017; 45: 544-50.
2. 学会発表
 - 1) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、山下依子、久野壽也、高橋智、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第106回日本病理学会総会、東京（2017年4月）
 - 2) 鈴木周五、加藤寛之、不二哲、内木綾、山下依子、久野壽也、高橋智、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第76回日本癌学会学術総会、横浜（2017年9月）
 - 3) 鈴木周五、内木綾、加藤寛之、高橋智、前立腺発がん物質の早期検出モデルの確立、第34回日本毒性病理学会総会および学術集会、沖縄（2018年1月）

- 4) 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ニコチンの影響、第107回日本病理学会総会、札幌（2018年6月）
- 5) 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ニコチンの影響、第77回日本癌学会学術総会、大阪（2018年9月）
- 6) 鈴木周五、加藤寛之、不二哲、内木綾、高橋智、ラット膀胱発がんに対するニコチンの影響、第35回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京（2019年1月）
- 7) 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）
- 8) 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）
- 9) 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

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。

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。平成29年度から30年度に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。令和元年度には、遺伝毒性肝発がん物質のうち偽陰性となった6物質について投与濃度を上げて検討した。その結果、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。

平成29年度は、我々が構築した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルを確立するために、11種類の遺伝毒性肝発がん物質及び20種類のそれ以外の化合物（非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の遺伝毒性および非遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性非発がん物質）について、ラット単回投与試験を行い、得られた遺伝子発現データを予測モデルに入力し、判定を行った。

平成30年度は、我々が構築した遺伝子セットを用い

た遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルを確立するために、12種類の遺伝毒性肝発がん物質及び17種類のそれ以外の化合物（非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の遺伝毒性および非遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性非発がん物質）について、ラット単回投与試験を行い、得られた遺伝子発現データを予測モデルに入力し、判定を行った。

令和元年度度は、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

平成29年度から令和元年度まで、遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質合計60種類について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。動物試験および遺伝子解析は3施設（香川大・藤田医科大・大阪市立大）で行われた。

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

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

各施設で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った。本モデルでは、遺伝毒性肝発がん物質を「陽性」、その他の物質（非

遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の発がん物質、非発がん物質)を「陰性」と判定する。

平成 29 年度は、全ての遺伝毒性肝発がん物質(11 物質)について陽性判定が得られ(感度 100%)、遺伝毒性陰性の非発がん物質 20 物質のうち、Ethionamide を除く 19 物質で陰性判定が得られた(特異度 95%)。平成 30 年度は、遺伝毒性肝発がん物質 12 物質のうち、6 物質について陽性判定が得られ(感度 46%)、その他の全ての物質(17 物質)で陰性判定が得られた(特異度 100%)。令和元年度では、偽陰性であった 6 物質のうち、Hydrazine sulfate については、LD50 の 1/2 および 2/3 投与量で、Dichloroacetic acid については LD50 の 2/3 投与量で、陽性となった。

以上より、検討した 60 物質での結果は、感度 82.6%(19/23)(表 1)、特異度 97.3%(36/37)(表 2)となった。

表 1. 遺伝毒性肝発がん物質の判定結果

被検物質	判定結果	正否
2-Nitropropane (2-NP) (陽性対照物質)	Positive	○
N-Nitrosodiethylamine (NDEA)	Positive	○
Nitrosoheptamethyleneimine (NHMI)	Positive	○
N-Nitrosodiethanolamine (NDELA)	Positive	○
N-Nitrosoethylmethylamine (DEMA)	Positive	○
Nitrosodibutylamine (DBA)	Positive	○
N-Nitrosopyrrolidine (NPYR)	Positive	○
3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (DMAB)	Positive	○
o-Aminoazotoluene (AAT)	Positive	○
N-Nitrosodimethylamine (DMN)	Positive	○
4,4'-Thiodianiline (TDA)	Positive	○
Benzidine (BZ)	Negative	×
Auramine-O (AO)	Positive	○
Hydrazine (HZ)	Negative	×
4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)	Negative	×
Monocrotaline (MCT)	Positive	○
4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline) (MBOCA)	Positive	○
Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate (TDCPP)	Positive	○
Retrorsine (RTS)	Positive	○
Vinyl bromide (VB)	Negative	×
Dichloroacetic acid (DCA)	Positive	○
Hydrazine sulfate (HS)	Positive	○
Acid Red 26 (AR-26)	Positive	○

D. 考察

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。

表 2. その他の物質の判定結果

被検物質	判定結果	正否
Ames(-)/肝発がん性(+))		
Phenobarbital (PB)	Negative	○
Hexachlorobenzene (HCB)	Negative	○
Carbon tetrachloride (CCL4)	Negative	○
Gemfibrozil (GFZ)	Negative	○
Ethinylestradiol (EE)	Negative	○
Coumarin	Negative	○
Ames(+)/肝以外の臓器発がん性(+))		
Cyclophosphamide (CPA)	Negative	○
Nitrofurantoin (NFT)	Negative	○
Phenacetin (PCT)	Negative	○
Ethylene thiourea (ETU)	Negative	○
Ames(+)/発がん性(-))		
2,4-Dinitrotoluene (DNT)	Negative	○
Isoniazid (INH)	Negative	○
Ames(-) 肝以外の臓器発がん性(+))		
Indomethacin (IM)	Negative	○
Phenylbutazone (PhB)	Negative	○
Butylated hydroxyanisole (BHA)	Negative	○
Methimazole (MTZ)	Negative	○
Sulfasalazine (SS)	Negative	○
Ames(-)/発がん性(-))		
Diazepam (DZP)	Negative	○
Disulfiram (DSF)	Negative	○
Phenytoin (PHE)	Negative	○
Rotenone (ROT)	Negative	○
Tolbutamide (TLB)	Negative	○
Aspirin (ASA)	Negative	○
Triamterene (TRI)	Negative	○
Promethazine (PMZ)	Negative	○
Sulindac (SUL)	Negative	○
Tetracycline (TC)	Negative	○
Ethionamide (ETH)	Positive	×
Theophylline (TEO)	Negative	○
Caffeine (CAF)	Negative	○
Chloramphenicol (CMP)	Negative	○
Allyl alcohol (AA)	Negative	○
Furosemide (FUR)	Negative	○
Chlorpheniramine (CHL)	Negative	○
Chlorpropamide (CPP)	Negative	○
Methyldopa (MDP)	Negative	○

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-toluidine 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 Scirrhus Gastric Cancer Cell Line with FGFR2 Overexpression, OCM-14. *Ann Surg Oncol*. 26: 2019; 1093-1102.
- 8) 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.
- 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.
- 11) Okuno T, Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. mTOR Activation in Liver Tumors Is Associated with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Both Mouse Models and Humans. *Cancers (Basel)*. 2018; 10: 465.
- 12) Gi M, Fujioka M, Yamano S, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Yamaguchi T, Tago Y, Kitano M, Hayashi SM, Wanibuchi H. Chronic dietary toxicity and carcinogenicity studies of dammar resin in F344 rats. *Arch Toxicol*. 2018; 92: 3565-83.
- 13) Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. In vivo positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats. *Arch Toxicol*. 2018; 92: 3207-21.
- 14) Fukushima S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Matsumoto M. Quantitative Approaches to Assess Key Carcinogenic Events of Genotoxic Carcinogens. *Toxicol Res*. 2018; 34: 291-6.
- 15) Shimizu Y, Tamada S, Kato M, Takeyama Y, Fujioka M, Kakehashi A, Nakatani T, Wanibuchi H, Gi M. Steroid sulfatase promotes invasion through epithelial-mesenchymal transition and predicts the progression of bladder cancer. *Exp Ther Med*. 2018; 16: 4463-70.
- 16) Oikawa D, Shiota M, Tokunaga F, Wanibuchi H. Generation of Rat Monoclonal Antibodies Specific for DZIP3. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2018; 37: 153-7.
- 17) Oikawa D, Shiota M, Goto E, Komakura K, Wanibuchi H, Tokunaga F. Generation of Rat Monoclonal Antibodies Against a Deubiquitinase, Ovarian Tumor Domain-Containing Protein 1. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2018; 37: 180-4.
- 18) Kitajima S, Lee KL, Fujioka M, Sun W, You J, Chia GS, Wanibuchi H, Tomita S, Araki M, Kato H, Poellinger L. Hypoxia-inducible factor-2 alpha up-regulates CD70 under hypoxia and enhances anchorage-independent growth and aggressiveness in cancer cells. *Oncotarget*. 2018; 9: 19123-35.
- 19) Tachibana H, Gi M, Kato M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers. *Cancer Sci*, 2017; 108, 331-337.
- 20) Yamaguchi T, Gi M, Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp Toxicol Pathol*. 2017; 69, 1-7.
- 21) Ishii N, Gi M, Fujioka M, Yamano S, Okumura M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid exerts promotion effects on hepatobiliary carcinogenesis in a rat medium-term multiorgan

- carcinogenicity bioassay. *J Toxicol Pathol.* 2017; 30, 39-45.
- 22) Kakehashi A, Stefanov VE, Ishii N, Okuno T, Fujii H, Kawai K, Kawada N, Wanibuchi H. Proteome Characteristics of Non-Alcoholic Steatohepatitis Liver Tissue and Associated Hepatocellular Carcinomas. *Int J Mol Sci.* 2017; 18.
 - 23) Doi K, Fujioka M, Sokuza Y, Ohnishi M, Gi M, Takeshita M, Kumada K, Kakehashi A, Wanibuchi H. Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis. *In Vivo.* 31, 2017; 187-197.
 - 24) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Doi K, Okuno T, Kakehashi A, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 104 weeks. *J Toxicol Sci.* 2017; 42, 475-483.
 - 25) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Fukushima S, Wanibuchi H. Progression of Hepatic Adenoma to Carcinoma in *Ogg1* Mutant Mice Induced by Phenobarbital. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 8541064.
 - 26) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. Enhanced Susceptibility of *Ogg1* Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 18, 2017; pii: E1801.
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) 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)
 - 7) 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)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) 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)
 - 12) 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)
 - 13) 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)
 - 14) 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)
 - 15) 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)
 - 16) 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)
 - 17) 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)
 - 18) 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)
 - 19) 魏民、藤岡正喜、行松直、奥野高裕、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機. BBN 誘発マウス膀胱がんモデルにおける Acetazolamide の予防効果の検討. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 2 月)
 - 20) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、多胡善幸、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. NASH モデル TSOD マウスにおける肝臓腫瘍および肝臓組織のメタボローム解析. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 2 月)

- 21) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、梯アンナ、大石裕司、鰐渕英機。有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の経胎盤ばく露によるマウス肺発がん過程におけるヒストン修飾異常。第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 2 月)
- 22) 奥野高裕、行松直、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機。職業性膀胱癌に関わるヒト膀胱癌の特徴と実験病理学的解析。第 18 回分子予防環境医学研究会大会、愛知県 (2019 年 1 月)
- 23) 行松直、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機。o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性、発がんプロモーション作用の検討。第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 1 月)
- 24) 山口貴嗣、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機。ジフェニルアルシン酸の F344 ラットにおける慢性毒性試験及び発がん性試験。第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 1 月)
- 25) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、大石裕司、梯アンナ、鰐渕英機。マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序。日本毒性学会生体金属部会主催メタルバイオサイエンス研究会 2018、宮城 (2018 年 11 月)
- 26) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、大石裕司、梯アンナ、鰐渕英機。有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid のマウス経胎盤ばく露による発がん機序の検討。第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 27) 奥野高裕、行松直、藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐渕英機。Acetoaceto-o-toluidide はラット膀胱上皮細胞の増殖と DNA 傷害を誘発する。第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 28) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、藤岡正喜、多胡善幸、魏民、鰐渕英機。メタボリックシンドロームモデル TSOD マウスにおける NASH 肝臓組織及び腫瘍のメタボローム解析。第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 29) 魏民、藤岡正喜、奥野高裕、行松直、山口貴嗣、梯アンナ、鰐渕英機。ラットにおける 1,4-dioxane の変異原性と発がん性の定量的解析。第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 30) 鰐渕英機、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕。環境化学物質による発がん性と細胞傷害・修復の破綻。第 107 回日本病理学会総会、北海道 (2018 年 6 月) (ワークショップ)
- 31) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、魏民、鰐渕英機。非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の肝細胞と肝がんにおけるプロテオーム解析。第 107 回日本病理学会総会、北海道 (2018 年 6 月)
- 32) 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、魏民、鰐渕英機。NASH 由来の肝細胞癌における mTOR の活性化。第 107 回日本病理学会総会、北海道 (2018 年 6 月)
- 33) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、鰐渕英機。職業性胆管がんにおける疫学のおよび動物モデルでの知見。第 25 回日本がん予防学会学術総会、香川 (2018 年 6 月)
- 34) 行松直、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機。o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性の検討。第 33 回発癌病理研究会、静岡 (2018 年 8 月)
- 35) 熊田賢次、藤岡正喜、魏民、大石裕司、奥野高裕、梯アンナ、鰐渕英機。マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序。第 17 回分子予防環境医学研究会、三重 (2018 年 2 月)
- 36) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機。遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の開発。第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 37) 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機。2 つの NASH モデルマウスにおける病理組織学的所見の違い。第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 38) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐渕英機。マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序。第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 39) 梯アンナ、奥野高裕、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機。NASH の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析。第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 40) 熊田賢次、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、行松直、梯アンナ、鰐渕英機。O-Acetoacetotoluidide (AAOT) の毒性影響の検討。第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
- 41) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐渕英機。マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序。第 23 回ヒ素シンポジウム、茨城 (2017 年 12 月)
- 42) 鰐渕英機。芳香族アミンによる膀胱癌の臨床病理学的研究と AAOT の毒性、発がん性評価。第 45 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、山形 (2017 年 10 月)
- 43) 香山侑弘、魏民、藤岡正喜、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐渕英機。BBN 誘発マウス膀胱がんにおける Ink4a/Arf の役割の検討。第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 44) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、香山侑弘、熊田賢次、鰐渕英機。BBN 誘発マウス膀胱癌モデルにおける Acetazolamide の抑制効果の検討。第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 45) 藤岡正喜、魏民、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐渕英機。CD1 マウスにおけるジメチルアルシン酸 (DMA) の胎児期ばく露による発がん性。第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 46) 梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機。非アルコール性脂肪肝炎の肝臓組織や肝臓癌

におけるプロテオーム解析. 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)

- 47) 奥野高裕、梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機. NASH モデルマウスを用いた肝細胞癌の発がんメカニズム解析. 第 32 回発癌病理研究会、滋賀 (2017 年 8 月)
- 48) 鰐淵英機. 実験的アプローチを用いたヒ素発がん性の証明とその機序の解明. 第 106 回日本病理学会総会、東京 (2017 年 4 月)
- 49) 鰐淵英機、魏民、藤岡正喜、梯アンナ. ヒ素の発がんリスク評価. 第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2017 年 7 月)
- 50) 藤岡正喜、魏民、河内聡子、梯アンナ、鰐淵英機. 1,2-ジクロロプロパンおよびジクロロメタン複合

曝露によるマウス肝臓への影響. 第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2017 年 7 月)

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）
総合分担研究報告書

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。平成29年度から3年間にわたり遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質23物質についてラット単回投与を行い、投与24時間後の肝臓におけるマーカー遺伝子（10遺伝子）の発現データをqPCRで取得し、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いて肝発がん性を予測した。その結果、遺伝毒性肝発がん物質11物質のうち、7物質について陽性判定が得られ、その他の全ての物質（12物質）で陰性判定が得られた。研究班の結果を総合すると、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。今後、偽陰性物質について最大耐量を用いて再評価するとともに、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、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。

平成29年度から令和元年まで、我々が構築した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルを確立するために、11種類の遺伝毒性肝発がん物質及び12種類のそれ以外の物質（非遺伝毒性ラット肝発がん物質、遺伝毒性非ラット肝発がん物質及び非遺伝毒性非発がん物質）について、ラット単回投与試験を行い、得られた遺伝子発現データを予測モデルに入力し、判

定を行った。

B. 研究方法

遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質合計23種類について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。遺伝子発現については、リアルタイムPCRにてデータを取得した。リアルタイムRT-PCRは施設共通のプロトコールに従って行った。肝臓からのtotal RNA抽出とcDNAの合成はそれぞれRNeasy mini kit（キアゲン）とSuper Script VI VIL0 Maste Mix（invitrogen）のキットを使用した。

得られた遺伝子発現データを我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（サポートベクターマシンによる数理工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

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、遺伝毒性肝発がん物質を「陽性」、その他の物質（非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の発がん物質、非発がん物質）を「陰性」と判定する。その結果、遺伝毒性肝発がん物質の11物質のうち、7物質について陽性判定が得られ（表1）、その他の全ての物質（12物質）で陰性判定が得られた（表2）。

表1. 遺伝毒性肝発がん物質の判定結果

被検物質	判定結果	正否
2-Nitropropane (2-NP)	Positive	○
o-Aminoazotoluene (AAT)	Positive	○
N-Nitrosodimethylamine (DMN)	Positive	○
4,4'-Thiodianiline (TDA)	Positive	○
Benzidine (BZ)	Negative	×
Hydrazine (HZ)	Negative	×
4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)	Negative	×
Vinyl bromide (VB)	Negative	×
Dichloroacetic acid (DCA)	Positive	○
Hydrazine sulfate (HS)	Positive	○
Acid Red 26 (AR-26)	Positive	○

表 2. その他の物質の判定結果

被検物質	判定結果	正否
Ames(-)/肝発がん性(+)		
Hexachlorobenzene (HCB)	Negative	○
Carbon tetrachloride (CCL4)	Negative	○
Gemfibrozil (GFZ)	Negative	○
Ethinylestradiol (EE)	Negative	○
Ames(+)/発がん性(-)		
Isoniazid (INH)	Negative	○
Ames(-)/発がん性(-)		
Diazepam (DZP)	Negative	○
Disulfiram (DSF)	Negative	○
Phenytol (PHE)	Negative	○
Rotenone (ROT)	Negative	○
Tolbutamide (TLB)	Negative	○
Aspirin (ASA)	Negative	○
Triamterene (TRI)	Negative	○

D. 考察

非遺伝毒性ラット肝発がん物質、遺伝毒性非ラット肝発がん物質及び非遺伝性非発がん物質の合計 12 物質はすべて陰性と判定されたことから、本モデルは遺伝毒性肝発がん物質を高い特異度で検出できる可能性が示唆された。一方で、遺伝毒性肝発がん物質 11 物質のうち、4 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用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.
- 7) Okuno T, Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. mTOR Activation in Liver Tumors Is Associated with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Both Mouse Models and Humans. Cancers (Basel). 2018; 10: 465.
- 8) Gi M, Fujioka M, Yamano S, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Yamaguchi T, Tago Y, Kitano M, Hayashi SM, Wanibuchi H. Chronic dietary toxicity and carcinogenicity studies of dammar resin in F344 rats. Arch Toxicol. 2018; 92: 3565-83.
- 9) Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. In vivo positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats. Arch Toxicol. 2018; 92: 3207-21.
- 10) Fukushima S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Matsumoto M. Quantitative Approaches to Assess Key Carcinogenic Events of Genotoxic Carcinogens. Toxicol Res. 2018; 34: 291-6.
- 11) Shimizu Y, Tamada S, Kato M, Takeyama Y, Fujioka M, Kakehashi A, Nakatani T, Wanibuchi

- H, Gi M. Steroid sulfatase promotes invasion through epithelial-mesenchymal transition and predicts the progression of bladder cancer. *Exp Ther Med*. 2018; 16: 4463-70.
- 12) Tachibana H, Gi M, Kato M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers. *Cancer Sci*, 2017; 108, 331-337.
 - 13) Yamaguchi T, Gi M, Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp Toxicol Pathol*. 2017; 69, 1-7.
 - 14) Ishii N, Gi M, Fujioka M, Yamano S, Okumura M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid exerts promotion effects on hepatobiliary carcinogenesis in a rat medium-term multiorgan carcinogenicity bioassay. *J Toxicol Pathol*. 2017; 30, 39-45.
 - 15) Doi K, Fujioka M, Sokuza Y, Ohnishi M, Gi M, Takeshita M, Kumada K, Kakehashi A, Wanibuchi H. Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis. *In Vivo*. 31, 2017; 187-197.
 - 16) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Doi K, Okuno T, Kakehashi A, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 104 weeks. *J Toxicol Sci*. 2017; 42, 475-483.
 - 17) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Fukushima S, Wanibuchi H. Progression of Hepatic Adenoma to Carcinoma in *Ogg1* Mutant Mice Induced by Phenobarbital. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 8541064.
 - 18) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. Enhanced Susceptibility of *Ogg1* Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 18, 2017; pii: E1801.
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) 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) 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)
 - 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. Acetoacetotoluidide 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) 魏民、藤岡正喜、行松直、奥野高裕、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機. BBN 誘発マウス膀胱がんモデルにおける Acetazolamide の予防効果の検討. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 2 月)
 - 16) 梯アンナ、石井直美、奥野高裕、多胡善幸、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. NASH モデル TSOD マウスにおける肝臓腫瘍および肝臓組織のメタボローム解析. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 年 2 月)
 - 17) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の経胎盤ばく露によるマウ

- ス肺発がん過程におけるヒストン修飾異常. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京都 (2019 年 2 月)
- 18) 奥野高裕、行松直、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性膀胱癌に関わるヒト膀胱癌の特徴と実験病理学的解析. 第 18 回分子予防環境医学研究会大会, 愛知県 (2019 年 1 月)
 - 19) 行松直、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性、発がんプロモーション作用の検討. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京都 (2019 年 1 月)
 - 20) 山口貴嗣、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸の F344 ラットにおける慢性毒性試験及び発がん性試験. 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京都 (2019 年 1 月)
 - 21) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 日本毒性学会生体金属部会主催メタルバイオサイエンス研究会 2018、宮城 (2018 年 11 月)
 - 22) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid のマウス経胎盤ばく露による発がん機序の検討. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
 - 23) 奥野高裕、行松直、藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐淵英機. Acetoaceto-o-toluidide はラット膀胱上皮細胞の増殖と DNA 傷害を誘発する. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
 - 24) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、藤岡正喜、多胡善幸、魏民、鰐淵英機. メタボリックシンドロームモデル TSOD マウスにおける NASH 肝臓組織及び腫瘍のメタボローム解析. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
 - 25) 魏民、藤岡正喜、奥野高裕、行松直、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける 1,4-dioxane の変異原性と発がん性の定量的解析. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
 - 26) 鰐淵英機、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕. 環境化学物質による発がん細胞傷害・修復の破綻. 第 107 回日本病理学会総会、北海道 (2018 年 6 月) (ワークショップ)
 - 27) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、魏民、鰐淵英機. 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の肝細胞と肝がんにおけるプロテオーム解析. 第 107 回日本病理学会総会、北海道 (2018 年 6 月)
 - 28) 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、魏民、鰐淵英機. NASH 由来の肝細胞癌における mTOR の活性化. 第 107 回日本病理学会総会、北海道 (2018 年 6 月)
 - 29) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、鰐淵英機. 職業性胆管がんにおける疫学的および動物モデルでの知見. 第 25 回日本がん予防学会学術総会、香川 (2018 年 6 月)
 - 30) 行松直、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性の検討. 第 33 回発癌病理研究会、静岡 (2018 年 8 月)
 - 31) 熊田賢次、藤岡正喜、魏民、大石裕司、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 第 17 回分子予防環境医学研究会、三重 (2018 年 2 月)
 - 32) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の開発. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
 - 33) 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 2 つの NASH モデルマウスにおける病理組織学的所見の違い. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
 - 34) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
 - 35) 梯アンナ、奥野高裕、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. NASH の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
 - 36) 熊田賢次、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. O-Acetoacetoluidide (AAOT) の毒性影響の検討. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
 - 37) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 第 23 回ヒ素シンポジウム、茨城 (2017 年 12 月)
 - 38) 香山侑弘、魏民、藤岡正喜、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. BBN 誘発マウス膀胱がんにおける Ink4a/Arf の役割の検討. 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
 - 39) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、香山侑弘、熊田賢次、鰐淵英機. BBN 誘発マウス膀胱発がんモデルにおける Acetazolamide の抑制効果の検討. 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
 - 40) 藤岡正喜、魏民、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. CD1 マウスにおけるジメチルアルシン酸 (DMA) の胎児期ばく露による発がん性. 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
 - 41) 梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 非アルコール性脂肪肝炎の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析. 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
 - 42) 奥野高裕、梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. NASH モデルマウスを用いた肝細

胞癌の発がんメカニズム解析. 第 32 回発癌病理研究会、滋賀 (2017 年 8 月)

- 43) 鰐渕英機、魏民、藤岡正喜、梯アンナ. ヒ素の発がんリスク評価. 第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2017 年 7 月)
- 44) 藤岡正喜、魏民、河内聡子、梯アンナ、鰐渕英機. 1,2-ジクロロプロパンおよびジクロロメタン複合曝露によるマウス肝臓への影響. 第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2017 年 7 月)

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

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

研究分担者 横平 政直 香川大学医学部腫瘍病理学 准教授

研究要旨

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年度は、TGP由来ラット肝臓遺伝子発現データをもとに構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力を検証するため、多種類の遺伝毒性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、遺伝子セットを用いた判定方法により、遺伝毒性発がん物質が正確に判定されており、この方法は遺伝毒性発がん物質の検出に有用性が確認された。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

平成29年度では、遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の発がん物質10種類について（表1）、平成30年度では、遺伝毒性肝発がん物質を含めた発がん物質10種類について（表2）、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（表3）について検討を行った。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。動物試験は3施設（担当：鰐淵/魏、塚本、横平）で行われた。動物試験プロトコルは事前に共有・配布し、プロトコルに従い試験を実施した。遺伝子発現については、リアルタイムPCRでのデータを取得した。

日本チャールズリバー社（神奈川県厚木）より購入した4週齢のSDラット（雄性）について、2週間の馴化期間の後に実験を開始した。群構成を表2に示す。馴化期間に体重測定を行い、各群の平均体重にばらつきがないよう群分けを行った。実験開始時に、体重測定を行いながら体重当たりの投与量に調整した被験物質を各動物に強制胃内投与した。被験物質の投与濃度は平成29年度および平成30年度はLD50の1/3とし、平成31年度は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

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volumeで行った。サーマルサイクラーによる反応は、25°C:10min、50°C:10min、85°C:5min、4°C:∞とした。QPCR用サンプルは「RT反応液(20μl)+ MilliQ 80 μl=100 μl」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

平成29年度の実験では、被験物質投与後24時間後に2-Nitrosopropane群の1匹、3'-Methyl-4-dimethylamino azobenzeneの3匹の死亡が確認された。

肝臓の病理組織所見では、2-Nitrosopropane群はうっ血、門脈域を中心とする炎症細胞浸潤(多形核白血球、リンパ球)を認めた。5匹中3匹が死亡した3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene群(9群)は、肝組織に著変は見られなかった。その他の群では、陰性対照群とくらべて、わずかな炎症細胞浸潤～変化は乏しい印象であった。

平成30年度の実験では、検討予定であった物質のVinyl chlorideについて、予定濃度の試薬を入手することが困難であり、この群は実験から削除した。

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

肝臓の病理組織所見では、2-Nitrosopropane群は平成29年度と同様の像を認めたが、その他の群では、陰性対照群とくらべて、わずかな炎症細胞浸潤～変化は乏しい印象であった。

令和元年度(平成31年度)の実験では、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5に示す。非遺伝性発がん物質のethionamideが遺伝性発がん物質として判定された。それ以外の被験物質については、遺伝性発がん物質である物質は遺伝性発がん物質と判定された。また、4,4'-Oxydianiline、2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene)は

遺伝性発がん物質として判定されるべきところ、陰性と判定された。

これらの偽陰性だった物質について、令和元年度(平成31年度)は検証を行った。偽陰性の原因が、投与濃度の低さによるものと仮定して、より高濃度での検証を行った。その結果、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

非遺伝性毒性発がん物質であるethionamideが遺伝性毒性物質として判定された。*in vitro*遺伝毒性試験では毒性を引き起こす用量で遺伝毒性陽性があるという報告がある(Kirkland et al., 2016)。今回の投与量はLD50の1/3量という高い投与量であった。このため、ethionamideが遺伝毒性作用を発揮したと推測される。2,4-Dinitrotolueneについては、Ames試験は陽性であるものの、*in vivo*においての肝発がん性は乏しいという報告があった(Leonard TB. et al., 1987)。この報告は本試験系での陰性の理由を支持するものである。一方で、4,4'-Oxydianilineについては、ラットにおける明らかな肝発がんが報告されている(Maronpot RR. et al., 1989)。Ethylene thioureaについては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がん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 平成 29 年度の実験における群構成

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

表 2 平成 30 年度の実験における群構成

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

表 3 令和元年度 (平成 31 年度) の実験における群構成

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4 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	ggcctgccctcacttaaa	agcggtaagaaagctctgga
Atp6v1f	tgaaatcgaagacactttcagg	gctcctggacgggatct
Rage	ccagtcacaactggtcattctc	cagactagtcggccctgt
Cdkn1a	gatccacagcgatatcgagac	acatcaccaggatcgacat
Fam49a	cacactcttcctggatttga	aggatgctctcggaatctg
Glrx3	ccacagtgtgtacagatgaacg	aacagcttcggcttcag
Nudt5	ggctacaaaggtgacattgct	gcagtttgacaagcctggat
Phlda3	accacgaggcataccatttt	caaccaaccaaagtggacag
RGD1308114	atggcctcggtatggagatg	tgctctgacatcttgaacttg

表5 判定結果

Chemicals	Predicted (Carcinogenicity)
平成29年度	
2-Nitrosopropane (Ex 1)	[Positive]
Nitrosodibutylamine	[Positive]
N-nitrosopyrrolidine	[Positive]
Promethazine	[Negative]
Sulindac	[Negative]
Tetracycline	[Negative]
2-Nitrosopropane (Ex 2)	[Positive]
3-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene	[Positive]
Ethionamide	[Positive]
Theophylline	[Negative]
Caffeine	[Negative]
Chloramphenicol	[Negative]
平成30年度	
2-Nitrosopropane- 2	[Positive]
4,4'-Oxydianiline	[Negative]
4,4'-Methylene	[Positive]
2,4-Dinitrotrouene	[Negative]
Tris	[Positive]
Retororsine	[Positive]
Butylated hydroxyanisole	[Negative]
Methimazole	[Negative]
Sulfasalazine	[Negative]
Allyl alcohol	[Negative]
令和元年度 (平成31年度)	
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）
総合分担研究報告書

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

環境中の化学物質の発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は課題である。本研究では、6週齢オス Sprague-Dawley (SD) ラット単回強制胃内投与試験を行い、24時間後に肝から total RNA を抽出後、real time RT-PCR 法により 10 遺伝子 (1385132_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) の発現データを取得し、対照群を 0 としたときの $\Delta\Delta Ct$ 値を用いて、サポートベクターマシーン (SVM) による肝発がん性予測数理的モデルを用いて、化学物質を遺伝毒性肝発がん物質とその他の化学物質 (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) に分類、評価するシステムの検証を行った。その結果、24 時間という超短期間で、10 遺伝子の発現量の変動を解析することにより、概ね遺伝毒性肝発がん性の予測が可能なモデルの構築が可能と判断された。従来との知見と異なる評価となったものがあつたが、今後、用量依存性、代謝特異性等、更なる検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

平成 29 年度、平成 30 年度は、種々の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について、検討を行った。

平成 29 年度は、4 種類の遺伝毒性肝発がん物質 (Group 1 (G1): N-Nitrosodiethylamine (NDEA), G2: N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), G3: N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), G4: 2-Nitropropane (2-NP))、2 種類の非遺伝毒性肝発がん物質 (G5: Monocrotaline (MCT), G6: Phenobarbital (PB))、3 種類の遺伝毒性非肝発がん物質 (G7: Cyclophosphamide (CPA), G8: Nitrofurantoin (NFT), G9: Phenacetin (PCT))、2 種類の非遺伝毒性非肝発がん物質 (G10: Indomethacin (IM), G11: Phenylbutazone (PhB))、および対照群 (G12: 0.5% Methyl cellulose (MC)) を用いた。

平成 30 年度は、5 種類の遺伝毒性肝発がん物質として、G3: 90 mg/kg BW Nitrosoheptamethyleneimine, G4: 610 mg/kg BW Ethylene thiourea, G5: 100 mg/kg BW Benzidine、G6: 500 mg/kg BW Auramine-O、G7: 20 mg/kg BW Hydrazine を使用した。その他の化学物質として、

G8: 870 mg/kg BW Furosemide (FUR)、G9: 40 mg/kg BW Chlorpheniramine (CHL)、G10: 720 mg/kg BW Chlorpropamide (CPP)、G11: 1670 mg/kg BW Methyl dopa (MDP) を用いた。また、G12 として 0.5% Methyl cellulose (MC) 投与群を設けた。

令和元年度は、偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質 Vinyl Bromide および Hydrazinium Sulfate について再検を試み、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)。

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、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)、10 遺伝子 (1385132_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) について、real time RT-PCR 法により遺伝子発現データを取得した。結果は、対照群を 0 としたときの $\Delta\Delta Ct$ 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

溶媒である 0.5% Methyl cellulose (MC) を陰性対照とし、 $\Delta \Delta Ct$ 値=0 と設定した時の 10 遺伝子 (1385132_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) の $\Delta \Delta Ct$ 値を求めた。

SVM による解析の結果、平成 29 年度は、4 種類の遺伝毒性肝発がん物質 N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), 2-Nitropropane (2-NP)、1 種類の非遺伝毒性肝発がん物質 Monocrotaline (MCT) が陽性と判定された。

一方、1 種類の非遺伝毒性肝発がん物質 Phenobarbital (PB))、3 種類の遺伝毒性非肝発がん物質 Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT))、2 種類の非遺伝毒性非肝発がん物質 Indomethacin (IM), Phenylbutazone (PhB) は陰性と評価された。

平成 30 年度の結果では、遺伝毒性肝発がん物質のうち、2 物質 Nitrosoheptamethyleneimine、Auramine-0 は陽性判定となったが、3 物質 Ethylene thiourea、Benzidine、Hydrazine は陰性判定となった。

令和元年度は、前年度までに偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質 Vinyl Bromide および Hydrazinium Sulfate について再検を試みた結果、Vinyl Bromide は陰性となったが、Hydrazinium Sulfate の低用量、高用量の 2 群は用量依存性を持って陽性と判定された。

D. 考察

SVM による予測モデルによる解析の結果、遺伝毒性肝発がん物質 N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), 2-Nitropropane (2-NP), Nitrosoheptamethyleneimine、Auramine-0、Hydrazinium Sulfate は正しく評価された。

また、1 種類の非遺伝毒性肝発がん物質 Phenobarbital (PB))、3 種類の遺伝毒性非肝発がん物質 Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT))、2 種類の非遺伝毒性非肝発がん物質 Indomethacin (IM), Phenylbutazone (PhB) は陰性と正しい判定となった。

しかし、非遺伝毒性肝発がん物質 Monocrotaline (MCT) が陽性、遺伝毒性肝発がん物質 Vinyl Bromide は陰性との予想と異なる評価となった。

以上の如く概ね予測通りの評価が得られた。

E. 結論

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

用量依存性、代謝特異性等、更なる検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakagawa M, Sakai Y, Kiriyama Y, Tahara T, Horiguchi N, Okabe A., Tahara S, Shibata T, Ohmiya N, Kuroda M, Sugioka A, Tsukamoto T. Eradication of Helicobacter pylori Induces Immediate Regressive Changes in Early Gastric Adenocarcinomas. Pathobiology. 2019; 86: 135-144.
- 2) Okabe A, Kiriyama Y, Suzuki S, Sakurai K, Teramoto A, Kato H, Naiki-Ito A, Tahara S, Takahashi S, Kuroda M, Sugioka A, Tsukamoto T. Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker gamma-H2AX. J Toxicol Pathol. 2019; 32: 91-99.
- 3) Tahara S, Tahara T, Horiguchi N, Kato T, Shinkai Y, Yamashita H, Yamada H, Kawamura T, Terada T, Okubo M, Nagasaka M, Nakagawa Y, Shibata T, Yamada S, Urano M, Tsukamoto T, Kurahashi H, Kuroda M, Ohmiya N. DNA methylation accumulation in gastric mucosa adjacent to cancer after Helicobacter pylori eradication. Int J Cancer. 2019; 144: 80-88.
- 4) 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.

2. 学会発表

- 1) 岡部麻子、桐山諭和、鈴木周五、櫻井浩平、高橋智、塚本徹哉、DNA 二重鎖切断マーカー γ -H2AX を用いた胃発がん物質の短期同定、第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集會、沖縄 (2018 年 1 月)
- 2) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、フラインクチューニングした Deep Convolutional Neural Networks によるヒト肺癌細胞像の自動分類。第 107 回日本病理学会総会、札幌 (2018 年 6 月)
- 3) 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會、徳島 (2019 年 6 月)
- 4) 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. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。

2. 実用新案登録
なし。

3. その他
なし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総合分担研究報告書

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

研究代表者 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。本研究班では、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。まずは遺伝毒性ラット肝発がん物質として、2-Nitropropane (2-NP ; 陽性対照) o-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 4,4'-Thiodianiline (TDA)、非遺伝毒性非肝発がん物質: Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI)をそれぞれラットに投与し、24 時間後に肝臓に生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。得られたデータを主成分解析 (PCA)解析により分類したところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性非発がん物質の3つのグループに分離できた。さらに遺伝毒性ラット肝発がん物質として、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; 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。PCA-DA により、コントロール及び非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。次に、同データを用いて遺伝毒性/肝発がん性の予測モデルを開発することを試みた。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。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。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ことが、アダクトーム法を化学物質のリスク評価へ応用することの妥当性を評価する上で必要である。

A. 研究目的

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

シチジン、ε-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

① 平成29年度

雄性 SD ラット (各群それぞれ5匹) に遺伝毒性肝発がん物質; 2-Nitropropane (2-NP ; 陽性対照), o-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 4,4'-Thiodianiline (TDA)、非遺伝毒性非肝発がん物

質; Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI)を各種濃度(表1参照)で投与を行った後24時間後に肝臓を摘出した。DNAを抽出後、DNaseI、スクレアーズP1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、LC-TOF MSに供しDNA付加体の網羅解析を行った。得られたデータはSCIEX社が提供するバイオインフォマティクス解析ソフトウェアを用い、デオキシリボヌクレオチドに特徴的なニュートラルロス(-116.04736)及び各種核酸に特異的なニュートラルロス(-152.0572; dG, -136.0623; dA, -112.0511; dC, -127.0508; dT)を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように系をデザインした。得られたデータを主成分(PCA)解析により解析した。更に、これら投与化学物質に由来する特徴的な付加体の探索をバイオインフォマティクス解析によりスクリーニングし、我々が構築したin-house DNA adduct databaseとの比較により、これら付加体の同定を試みた。

② 平成30年度

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), 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; Indomethacin(IM), Phenylbutazone(PhB), Promethazine(PMZ), Sulindac(SUL), Tetracycline(TC), Ethionamide(ETH), Theophylline(TEO), Caffeine(CAF), Chloramphenicol(CMP)を各種濃度(表2参照)で投与を行った後24時間後に肝臓を摘出し、前年度と同様の方法でDNAを抽出し、DNAアダクトーム解析を実施した。

③ 令和1年度

前年度までにアダクトームで得られたデータを用い、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て遺伝毒性/肝発がん性予測モデルの開発を試みた。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

① 平成29年度

各種化学物質を投与したラット肝臓DNAのアダクトーム解析を行なった結果を図1に示す。PCA解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の3つのグループに分離されることがわかった。遺伝毒性肝発がん物質と非遺伝毒性非肝発がん物質から得られたデータをそれぞれ別々にPCAした結果、両者ともコントロールと分離されてはいるものの、非遺伝毒性非肝発がん物質ではあまりコントロールとの距離が離れていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された(図2)。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいことが予測された(図3)。つまり、遺伝毒性肝発がん物質由来のDNA付加体が生成していることが推測される。更に、これら投与化学物質に由来する特徴的な付加体の探索をバイオインフォマティクス解析により実施した。その結果、ボルケーノプロットより、遺伝毒性肝発がん物質に特徴的な付加体を幾つかスクリーニングした(図4、5)。我々が構築したin-house DNA adduct databaseとの比較により、これら付加体の同定を試みたが、類似するm/z値を持つ付加体はほとんど見つからなかった。

表1 使用した化学物質

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

② 平成30年度

平成29年度に試験した化学物質に加え、新たに被験物質を追加しラット肝臓DNAのアダクトーム解析を行なった。使用した化学物質を表2に、アダクトームデータを用い解析した結果を図6に示す。PCA-DA解析を行なったところ、コントロール及び非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。前回の報告と同じく、非遺伝毒性非発がん物質及びコントロール、遺伝毒性肝発がん物質でPCA-DA会席を行ったところコントロールと非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の2つのグループに分離できた(図7)。非遺伝毒性非発がん物質ではあまりコント

ロールと分離が出来ていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいことが予測された。遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質では距離があまり離れていないプロットが存在した。そこで、遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質においてコントロールとともにPCA-DA解析を行ったところコントロールと遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質それぞれで分離することができた(図8)。そのため、非遺伝毒性物質と遺伝毒性非発がん物質は本来であれば、別の物質として区別することは出来るが、コントロールや非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質と比較すると比較的差が小さいため分離が出来なかったと予測された。しかし、非遺伝毒性肝発がん物質は遺伝毒性非発がん物質と比べ比較的遺伝毒性肝発がん物質よりもプロットしている傾向があることから、プロットにおいて、発がん性の有無の要素の関与が大きいと予測された。これらのことから、発がんに関与する物質であるDNA付加体が生成していることが推測される。一方、ボルケーノプロットより、遺伝毒性肝発がん物質に特徴的な付加体をいくつかスクリーニングした。In-house database との比較から、adduct_545(m/z 282. 1185)はホルムアルデヒド、アルキル化剤、マロンジアルデヒドのいずれかに由来する付加体である可能性が示唆された(図9, 10)。また、adduct_75(m/z 569. 1211)はその m/z 値及びフラグメンテーションのデータから、dAを含む付加体であることが示唆された(図11)。

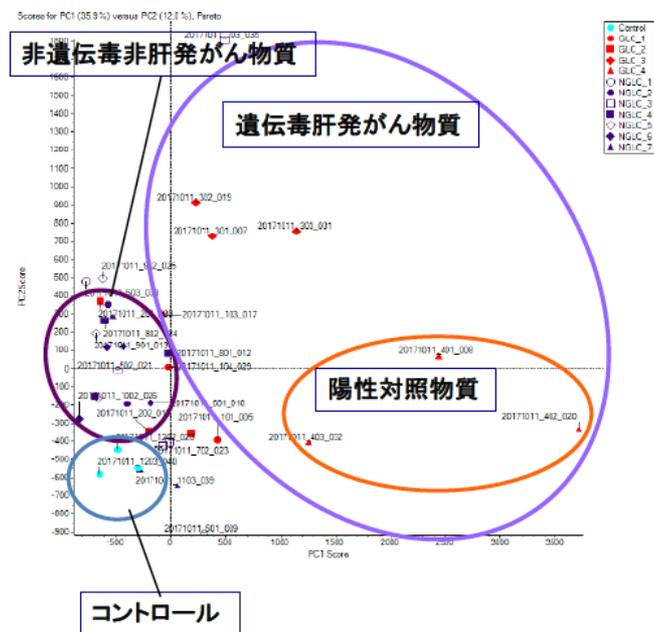


図1 遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)

非遺伝毒性非発がん物質

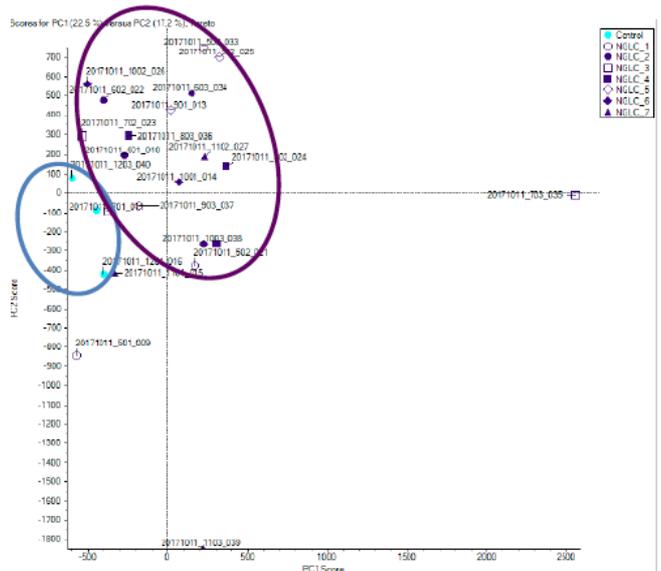


図2 非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)

遺伝毒性発がん物質

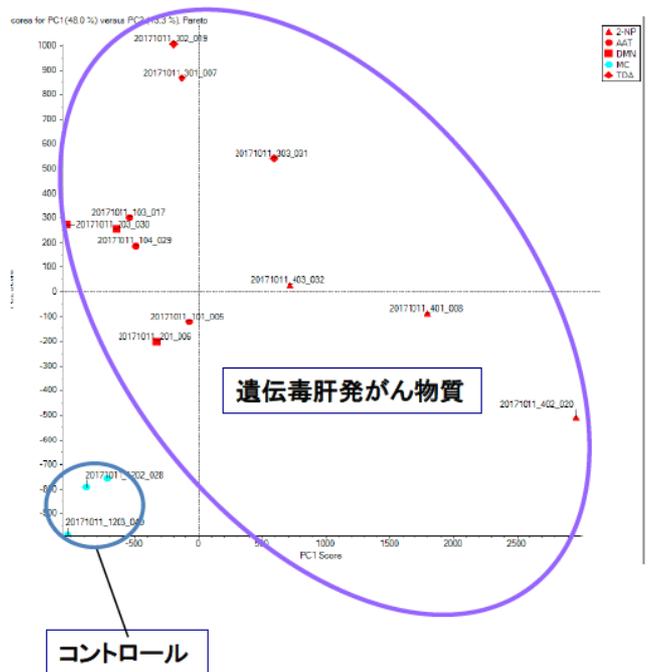


図3 遺伝毒性肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)

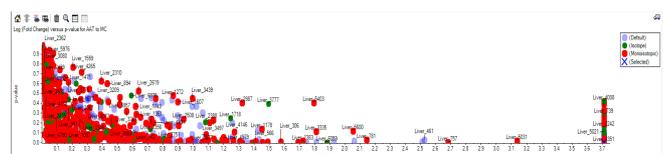


図4 ボルケーノプロットによる遺伝毒性/非遺伝毒性非肝発がん物質のグルーピングに寄与する付加体の探索

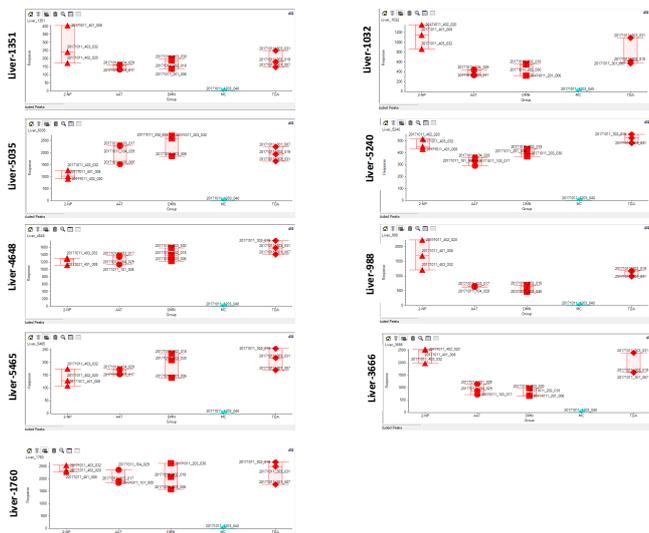


図5 ボルケーノプロットで抽出された付加体存在量（遺伝毒性化学物質に特徴的なもの）

表2 使用した化学物質

	遺伝毒性	発がん性	投与量 (mg/kg b.w./d)
p-Aminosalicylic acid (AAS)	+	+	500
Dimethylsulfoniopropionamide (DMSP)	+	+	10
4,4'-Thiobis(6-methyl-2-pyridinol) (TDA)	+	+	300
2-Nitropropene (2-NP, 陽性対照物)	+	+	240
N-Nitrosodimethylamine (NDEA)	+	+	70
N-Nitrosodimethylamine (NDMA)	+	+	2000
N-Nitrosodimethylamine (NEMA)	+	+	30
N-Nitrosodimethylamine (NDI)	+	+	40
N-Nitrosodipropylamine (NDP)	+	+	300
3-(3-Methyl-4-dimethylaminosulfonylphenyl)propanoic acid (MCPA)	+	+	300
Cyclophosphamide (CPA)	+	+	80
Nitrofurantoin (NFT)	+	+	200
Phthalocyanine (PCT)	+	+	580
Methoxychlor (MCT)	-	-	20
Phenobarbital (PB)	-	+	80
Diazepam (DZP)	-	-	80
Diazepam (DZF)	-	-	170
Phenacetin (PE)	-	-	580
Rofenone (ROT)	-	-	20
Telluric acid (TE)	-	-	830
Arginine (ASA)	-	-	70
Tenoxicam (TR)	-	-	130
Indomethacin (IM)	-	-	1
Phenylbutazone (PB)	-	-	80
Propylthiouracil (PTU)	-	-	190
Sulfindac (SL)	-	-	90
Tetracycline (TC)	-	-	270
Ethionamide (ET)	-	-	440
Theophylline (TE)	-	-	80
Caffeine (CAF)	-	-	80
Chloramphenicol (CM)	-	-	830
0.5% Methylcellulose (MC, 増粘剤)	-	-	5ml/kg

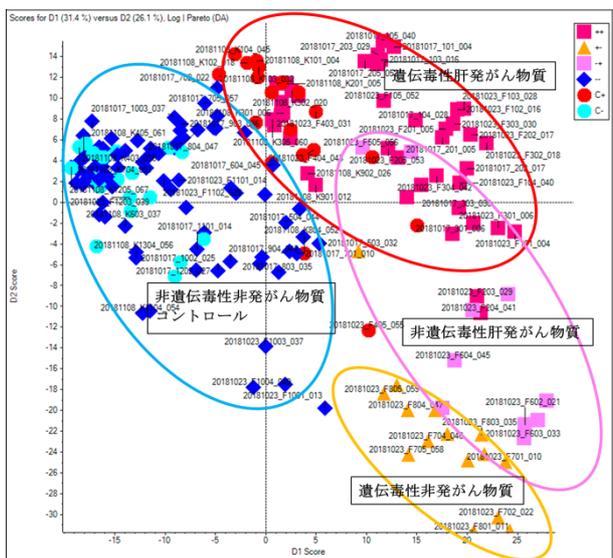


図6 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓におけ

るDNA損傷性の評価(PCA-DA解析による)

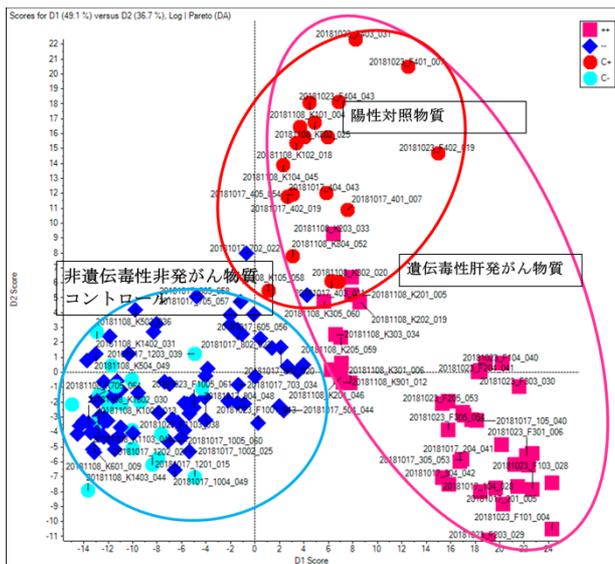


図7 コントロール/非遺伝毒性非発がん物質/遺伝毒性発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価 (PCA-DA解析による)

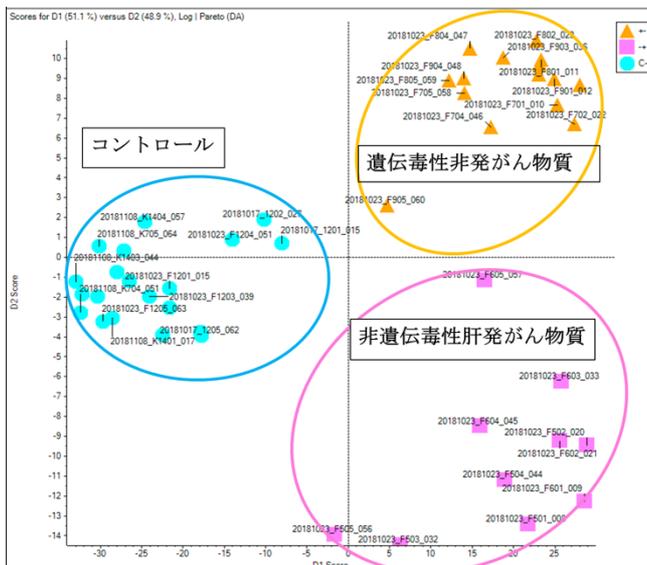


図8 非遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非発がん物質/の肝臓における DNA 損傷性の評価(PCA-DA 解析による)

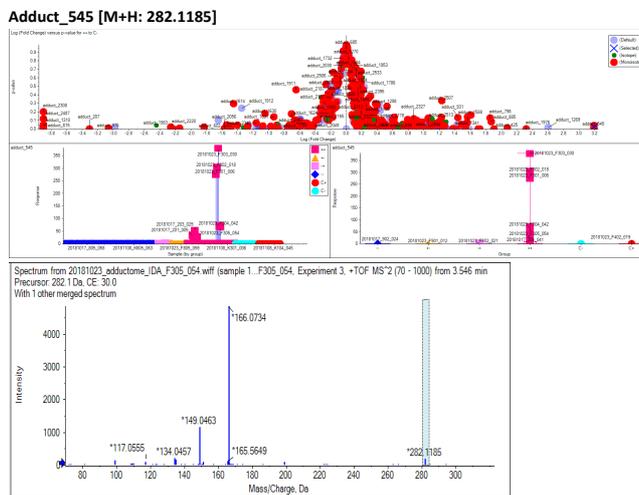
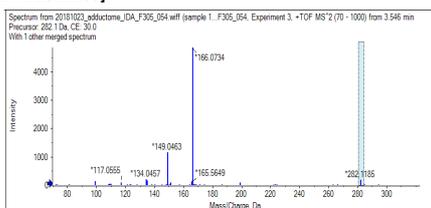


図9 ボルケーノプロットと Adduct 545 の MS fragment data

Adduct_545 [M+H: 282.1185]



付加体データベースとの比較による構造予測

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

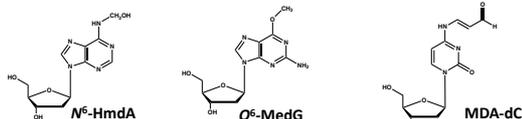


図 1 0 Adduct 545 の in-house database との比較による構造予測

Adduct_75 [M+H: 569.1211]

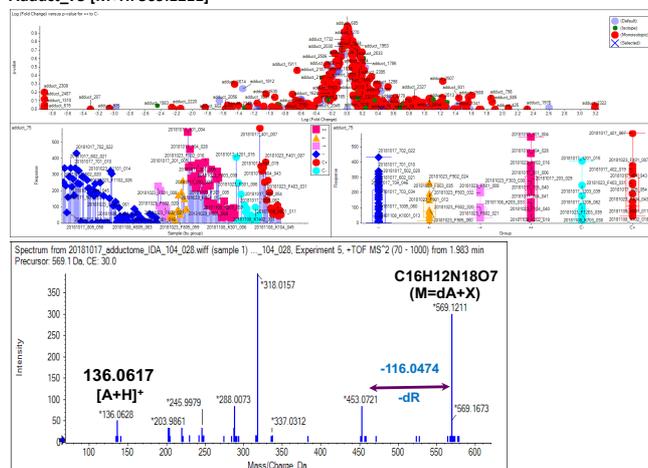


図 1 1 ボルケーノプロットと Adduct 75 の MS fragment data

③ 令和 1 年度

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 2 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

試作された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3)。

2) 肝発がん性の予測結果

試作された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4)。

3) 遺伝毒性/肝発がん性の予測結果

試作された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5)。

4) Leave-One-Out 交差検証により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6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。

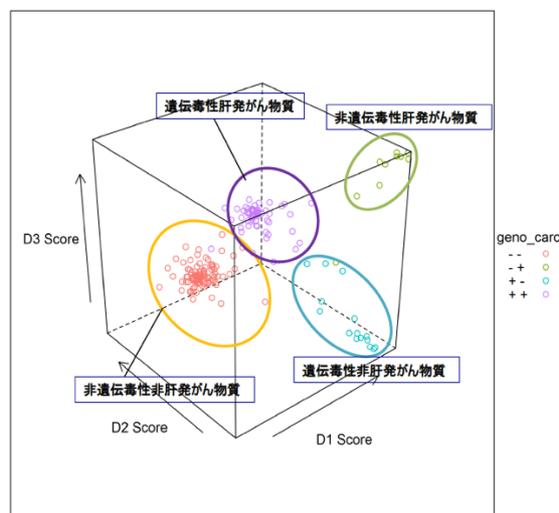


図 1 2 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(LDA解析による)

表 3 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4 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5 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6 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

遺伝毒性/非遺伝毒性非肝発がん物質を投与したラットの肝臓からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅解析を行なった。PCA解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の3つのクラスターに分離されることがわかった。遺伝毒性肝発がん物質と非遺伝毒性非肝発がん物質から得られたデータをそれぞれ別々にPCAした結果、両者ともコントロールと分離されてはいるものの、非遺伝毒性非肝発がん物質ではあまりコントロールとの距離が離れていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された。このことは、非遺伝毒性非肝発がん物質がDNA損傷（付加体）を殆ど作成しないため、その結果、溶媒対照とほとんど変化していないと推測される。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいために予想された。つまり、遺伝毒性肝発がん物質由来のDNA付加体が生成していることが推測される。遺伝毒性肝発がん物質とコントロールとの距離に着目してみたところ、2-NP（陽性対照）とTDAがよりコントロールと離れたクラスターを形成しており、AATとDMNがコントロールにやや近いクラスターを形成している。その理由については未だ分からないが、これら化学物質間でDNA損傷性や発がんメカニズムが異なることを示唆しているかもしれない。

さらに、平成30年では被験物質の追加を行い同様に検討した。PCA-DA解析を行なったところ、コントロール及び非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。前回の報告と同じく、非遺伝毒性非発がん物質及びコントロール、遺伝毒性肝発がん物質でPCA-DA解析を行ったところコントロールと非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の2つのグループに分離できた。非遺伝毒性非発がん物質ではあまりコントロールと分離が出来ていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいために予想された。遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質は距離があまり離れていないプロットが存在した。そこで、遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質、コントロールの3つの群のみでPCA-DA解析を行ったところコントロールと遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質それぞれで分離することが出来た。そのため、非遺伝毒性物質と遺伝毒性非発がん物質は本来であれば別の物質として区別することはできるが、コントロールや非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質と比較すると比較的差が小さいため分離

できないと考えられる。しかし、非遺伝毒性肝発がん物質は遺伝毒性非発がん物質と比べ比較的遺伝毒性肝発がん物質よりもプロットしている傾向があることから、プロットにおいて、発がん性の有無の要素の関与が大きいと予測された。これらのことから、発がんに関与する物質であるDNA付加体が生成していることが考えられる。

アダクトームデータがPCA-DAで、遺伝毒性/肝発がん性の違いにより綺麗に分離できたことから、同データを用いて遺伝毒性/肝発がん性の予測モデルを開発することを試みた。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, 非遺伝毒性非肝発がん物質としてDZP, DSF, PHE, ROT, TLB, ASA, TRIをそれぞれラットに投与し、24時間後に肝臓に生成されるDNA付加体を網羅的に解析した。得られたデータをPCA解析により分類したところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性非発がん物質の3つのグループに分離できた。さらに遺伝毒性ラット肝発がん物質として、NDEA, NDELA, NE MA, NB, NNP, MDA、遺伝毒性非発がん物質として、CPA, NF T, 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IM, PhB, PZ, SUL, TC, ETH, TE O, CAF, CMPをそれぞれラットに投与し、24時間後に肝臓に生成されるDNA付加体を網羅的に解析した。PCA-DAにより、コントロール及び非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。前回の報告と同じく、非遺伝毒性非発がん物質及びコントロール、遺伝毒性肝発がん物質でPCA-DA解析を行ったところコントロールと非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の2つのグループに分離できた(図7)。非遺伝毒性非発がん物質ではあまりコントロールと分離が出来ていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいことが予測された。遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質においてコン

トロールとともにPCA-DA解析を行ったところコントロールと遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質それぞれで分離することができた。そのため、非遺伝毒性物質と遺伝毒性非発がん物質は本来であれば、別の物質として区別することはできるが、コントロールや非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質と比較すると比較的差が小さいため分離が出来なかったと予測された。しかし、非遺伝毒性肝発がん物質は遺伝毒性非発がん物質と比べ比較的遺伝毒性肝発がん物質よりもプロットしている傾向があることから、プロットにおいて、発がん性の有無の要素の関与が大きいと予測された。つまり、発がんに関与する物質であるDNA付加体が生成していることが推測される。一方、ボルケーノプロットより、遺伝毒性肝発がん物質に特徴的な付加体を幾つかスクリーニングした。In-house databaseとの比較から、adduct_545(m/z 282. 1185)はホルムアルデヒド、アルキル化剤、マロンジアルデヒドのいずれかに由来する付加体である可能性が示唆された。また、adduct_75(m/z 569. 1211)はその m/z 値及びフラグメンテーションのデータから、dAを含む付加体であることが示唆された。

アダクトームデータがPCA-DAで、遺伝毒性/肝発がん性の違いにより綺麗に分離できたことから、同データを用いて遺伝毒性/肝発がん性の予測モデルを開発することを試みた。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ことが、アダクトーム法を化学物質のリスク評価へ応用することの妥当性を評価する上で必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y. Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin. *Genes Environ.* 2017; 39: 12.
- 2) Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by

- dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*. 2017; 32: 455-462.
- 3) Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology*. 2018, 38: 537-543.
 - 4) Fukai E, Sato H, Watanabe M, Nakae D, Totsuka Y. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci*. 2018; 109: 1024-1031.
 - 5) Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis*. in press.
 - 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 (3): 279-287.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl- β -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review. *Mutation Res*. 2020; 850-851: 503148.
2. 学会発表
- 1) 戸塚ゆ加里. DNA 付加体形成と突然変異誘発. 第 44 回日本毒性学会、横浜 (2017 年 7 月)
 - 2) Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H. Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS, ノースカロライナ (2017 年 9 月)
 - 3) Totsuka Y. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜 (2017 年 9 月)
 - 4) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆. マウス正常上皮の 3 次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系. 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜 (2017 年 9 月)
 - 5) 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築. 第 46 回日本環境変異原学会、東京 (2017 年 11 月)
 - 6) 前迫裕也、善家茜、アスマ・エルザワハリ、古川英作、加藤護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚ゆ加里. 次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索. 第 46 回日本環境変異原学会、東京 (2017 年 11 月)
 - 7) 秋場望、佐藤春菜、松田知成、遠藤治、稲葉一穂、戸塚ゆ加里. モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析. 第 46 回日本環境変異原学会、東京 (2017 年 11 月)
 - 8) 神尾翔真、斎藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里. 生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立. 第 46 回日本環境変異原学会、東京 (2017 年 11 月)
 - 9) Totsuka Y. Adductomics IWGT 2017、東京 (2017 年 11 月)
 - 10) Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H. Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis ^{12th}ICEM-^{5th}ACEM, 仁川 (2017 年 11 月)
 - 11) Totsuka Y. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017, つくば (2017 年 12 月)
 - 12) Totsuka Y. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics, コルカタ (2018 年 1 月)
 - 13) 戸塚ゆ加里、秋場望、佐藤春菜、前迫有也、松田知成、加藤護、アスマ・エルザワハリ、十時泰、柴田龍弘、中釜斉. 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする. 第 33 回発がん病理研究会、御殿場 (2018 年 8 月)
 - 14) 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下

- 幸平、小川久美子、若林敬二. 芳香族アミン類の代謝物分析と DNA 付加体. 第 33 回発がん病理研究会、御殿場 (2018 年 8 月)
- 15) Totsuka Y, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Nakagama H. Whole genome sequencing analysis elucidates the interaction between environmental factors and causes of human cancer. 第 77 回日本癌学会総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 16) 斎藤春五、高橋沙奈衣、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊. ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立. 第 77 回日本癌学会総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 17) 高橋沙奈衣、斎藤春五、新田見匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊. Fe³O₄ ナノ粒子の曝露された癌細胞における microRNAs のプロファイリングについて (II). 第 77 回日本癌学会総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 18) 戸塚ゆ加里、佐藤春菜、松田知成、加藤護、アスマ・エルザワハリ、遠藤治. 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする. 第 47 回日本環境変異原学会、京都 (2018 年 11 月)
- 19) 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築. 第 47 回日本環境変異原学会、京都 (2018 年 11 月)
- 20) 前迫侑也、椎崎一宏、高村岳樹、戸塚ゆ加里. 職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析). 第 47 回日本環境変異原学会、京都 (2018 年 11 月)
- 21) 神尾翔真、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里. ナノマテリアルの表面修飾が及ぼす遺伝毒性への影響. 第 47 回日本環境変異原学会、京都 (2018 年 11 月)
- 22) 斎藤春吾、渡邊昌俊、戸塚ゆ加里. ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立. 第 47 回日本環境変異原学会、京都 (2018 年 11 月)
- 23) 石野孔祐、前迫侑也、内藤善哉、戸塚ゆ加里. 質量分析データに基づく DNA 付加体データベースの整備. 第 47 回日本環境変異原学会、京都 (2018 年 11 月)
- 24) 戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としての DNA アダクトーム解析の展望. 日本毒性学会シンポジウム、徳島 (2019 年 6 月)
- 25) 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)
- 26) Totsuka Y. How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting, リヨン (2019 年 7 月)
- 27) Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using Comprehensive DNA Adduct Analysis (DNA Adductome Analysis) 2nd Hebei International Forum on Theory and Oractice of Cancer Prevention and Control、石家庄 (2019 年 7 月)
- 28) 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)
- 29) Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS、東京 (2019 年 11 月)
- 30) 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)
- 31) 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)

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。

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, 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
Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K.	Dose dependency of γ -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, Watabuchi 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, Marubashi S, Totokusa 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	3	368-376	2020

Teramoto A, <u>Tsukamoto T</u> , 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	15	e0229951	2020
<u>Totsuka Y</u> , Wakabayashi K.	Biological significance of aminophenyl- β -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review.	Mutation Res	850-851	503148	2020
Yukimatsu N, <u>Gi M</u> , Okuno T, Fujioka M, <u>Suzuki S</u> , Kakehashi A, Yanagiba Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, <u>Wanibuchi H</u> .	Promotion effects of acetoacetone- α -luidide 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, Tago Y, Kakehashi A, <u>Wanibuchi H</u> .	A chronic toxicity study of diphenylholarsinic acid in the drinking water of C57BL/6J mice for 52 weeks.	J Toxicol Pat	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, Kato K, Endo K, Yamano S, Kanaki Y, Matsumura Y, Minami T, Tanaka T, Anai M, Wada Y, <u>Wanibuchi H</u> , 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, Togano S, Kuroda K, Miki Y, Hirakawa K, Ohsawa M, <u>Wanibuchi H</u> , Ohira M.	Establishment of a New Scirrhous Gastric Cancer Cell Line with FGFR2 Overexpression, OCUM-14.	Ann Surg Oncol	26	1093-1102	2019
Okuno T, <u>Gi M</u> , Fujioka M, Yukimatu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, <u>Wanibuchi H</u> .	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, Osaki M, <u>Wanibuchi H</u> , Okada F, Oshimura M, Kugonoh H.	PITX1 protein interacts with ZCCHC10 to regulate hTERT mRNA transcription.	PLoS One	14:	e0217605	2019
<u>Gi M</u> , Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, <u>Wanibuchi H</u> .	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 prostatic state carcinogenesis in rats.	J Toxicol Pathol	32	73-7	2019
Okabe A, Kiriya Y, Suzuki S, Sakurai 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, Abdelgheib 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	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, Kawabara 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, Kato H, Nagayasu Y, Suzuki S, Kawahara N, Yasui T, Takahashi S.	DNCL1, 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, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K.	Comprehensive expression analysis of lncRNA and microRNA for investigation of compensatory mechanisms in the rat kidney after unilateral nephrectomy.	J Appl Toxicol	132	110643	2019
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	132	110643	2019
Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K.	Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with <i>o</i> -toluidine and <i>o</i> -anisidine.	Arch Toxicol	93	753-62	2019
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	32	205-12	2019
Sone M, Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Morikawa T, Nishikawa A, Ogawa K.	Immunohistochemistry of γ -H2AX as a novel method of early detection of urinary bladder carcinogenicity in mice.	J Appl Toxicol	39	868-76	2019
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 <i>Helicobacter pylori</i> -infected gerbils.	Gastroenterology	156	577-81	2019
Hirata T, Cho YM, Suzuki I, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K.	4-Methylthio-3-butyl isothiocyanate (MTBITC) induced apoptotic cell death and G2/M cell cycle arrest via ROS production in human esophageal epithelial cancer cells.	J Toxicol Sci	44	73-81	2019

Funahashi S, Okazaki Y, Nagai H, Chew SH, Ogawa K, <u>Toyoda T</u> , Cho YM, Toyokuni S.	Twist1 was detected in mesenchymal cells of mammary fibroadenoma and invasive components of breast carcinoma in rats.	J Toxicol Pathol	32	19-26	2019
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, Naiki-Ito 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, Kitawamura T, Terada T, Okubo M, Nagasaka M, Nakagawa Y, Shibata T, Yamada S, <u>Urano M</u> , <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
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, Matsuhashima 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 Nitrosopiperidine Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China.	Chem Res Toxicol	32 (8)	1515-1527	2019

Dertinger SD, <u>Totsuka Y</u> , Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL.	High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT).	Mutation Res	847	403022	2019
Okuno T, Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, <u>Gi M</u> , <u>Wanibuchi H</u> .	mTOR Activation in Liver Tumors Is Associated with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Both Mouse Models and Humans.	Cancers (Basel)	10	465	2018
<u>Gi M</u> , Fujioka M, Yamano S, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Yamaguchi T, Tago Y, Kitano M, Hayashi S M, <u>Wanibuchi H</u> .	Chronic dietary toxicity and carcinogenicity studies of dammar resin in F344 rats.	Arch Toxicol	92	3565-83	2018
<u>Gi M</u> , Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, <u>Wanibuchi H</u> , Fukushima S.	In vivo positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats.	Arch Toxicol	92	3207-21	2018
Fukushima S, <u>Gi M</u> , Fujioka M, Kakehashi A, <u>Wanibuchi H</u> , Matsumoto M.	Quantitative Approaches to Assess Key Carcinogenic Events of Genotoxic Carcinogens.	Toxicol Res	34	291-6	2018
Shimizu Y, Tamada S, Kato M, Takeyama Y, Fujioka M, Kakehashi A, Nakatani T, <u>Wanibuchi H</u> , <u>Gi M</u> .	Steroid sulfatase promotes invasion through epithelial-mesenchymal transition and predicts the progression of bladder cancer.	Exp Ther Med	16	4463-70	2018
Oikawa D, Shiota M, Tokunaga F, <u>Wanibuchi H</u> .	Generation of Rat Monoclonal Antibodies Specific for DZIP3.	Monoclon Antib Immunodiagn Immunother	37	153-7	2018

Oikawa D, Shiota M, Goto E, Komakura K, <u>Wanibuchi H</u> , Tokunaga F.	Generation of Rat Monoclonal Antibodies Against a Deubiquitinase, Ovarian Tumor Domain-Containing Protein 1.	Monoclon Antibody Immunodiagnosis Immunotherapy	37	180-4	2018
Kitajima S, Lee KL, Fujioka M, Sun W, You J, Chia GS, <u>Wanibuchi H</u> , Tomita S, Araki M, Kato H, Pfoellinger L.	Hypoxia-inducible factor-2 alpha up-regulates CD70 under hypoxia and enhances anchorage-independent growth and aggressiveness in cancer cells.	Oncotarget	9	19123-35	2018
Takeshita S, Yamashita Y, Shiomi K, Suzuki N, Yoshida J, Naiki-Ito A, <u>Suzuki S</u> , Akatsuka S, Toyokuni S, Takahashi T, Mase S, Arakawa A, Sugiura-Ogasawara M, Takahashi S.	Expression of P-REX2a is associated with poor prognosis in endometrial malignancies.	Oncotarget.	9	24778-8.	2018
<u>Suzuki S</u> , Kato H, Fuji S, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S.	Early detection of prostate carcinogenesis by immunohistochemistry of HMGB2.	J Toxicol Sci	43	359-67	2018
<u>Suzuki S</u> , Cohen SM, Arnold LL, Kato H, Fuji S, Pennington KL, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S.	Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis.	Toxicology	398-399	31-40	2018
Naiki T, Naiki-Ito A, Iida K, Etani T, Kato H, <u>Suzuki S</u> , Yamashita Y, Kawai N, Yasui T, Takahashi S.	GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis.	Oncotarget	9	15847-59	2018
Kuno T, Kato H, Naiki-Ito A, <u>Suzuki S</u> , Tanaka T, Takahashi S, Mori H.	Preventive Effects of Fermented Brown Rice and Rice Bran on Spontaneous Lymphomagenesis in AKR/NS1c Female Mice.	Asian Pac J Cancer Prev	19	3217-23	2018

Ito Y, Naiki-Ito A, Kato H, <u>Suzuki S</u> , Kuno T, Ishiguro Y, Takahashi S, Uemura H.	Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis is by the down-regulation of the androgen receptor.	Oncotarget	9	13859-69	2018
Hayashi Y, Nishiyama T, Nakatochi M, <u>Suzuki S</u> , Takahashi S, Sugiura-Ogasawara M.	Association of genetic variants of PolD1 with recurrent pregnancy loss.	Reprod Med Biol	17	195-202	2018
<u>Toyoda T</u> , Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K.	A 13-week subchronic toxicity study of acetaminophen using an obese rat model.	J Toxicol Sci	43	423-33	2018
Tanoue Y, <u>Toyoda T</u> , Sun J, Mustofa MK, Tateishi C, Endo S, Motoyama N, Arakaki K, Wu D, Okuno Y, Tsukamoto T, Takeyama M, Ihn H, Vaziri C, Tateishi S.	Differential roles of Rad18 and Chk2 in genome maintenance and skin carcinogenesis following UV exposure.	J Invest Dermatol	138	2550-7	2018
Matsushita K, <u>Toyoda T</u> , Morikawa T, Takahashi M, Inoue K, Ogawa K.	A 13-week subchronic toxicity study of 2-ethylbutanal in F344 rats.	Regul Toxicol Pharmacol	100	118-26	2018
Akagi J, Cho YM, Mizuta Y, <u>Toyoda T</u> , Ogawa K.	Subchronic toxicity evaluation of 5-hexenyl isothiocyanate, a nature identical flavoring substance from <i>Wasabia japonica</i> , in F344/DuCrj rats.	Food Chem Toxicol	122	80-6	2018
Furihata C, <u>Toyoda T</u> , Ogawa K, Suzuki T.	Using RNA-Seq with 11 marker genes to evaluate 1,4-dioxane compared with typical genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens.	Mutat Res	834	51-5	2018

Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K.	γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from <i>o</i> -toluidine and aniline.	J Appl Toxicol	38	537-43	2018
Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, <u>Toyoda T</u> , Sone M, Ogawa K.	Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice.	J Toxicol Pathol	31	73-80	2018
Hirata T, Cho YM, Suzuki I, <u>Toyoda T</u> , Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K.	4-Methylthio-3-but-enyl isothiocyanate mediates nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 activation by regulating reactive oxygen species production in human esophageal epithelial cells.	Food Chem Toxicol	111	295-301	2018
<u>Yokohira M</u> , Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Hashimoto N, Kinoshita S, Yoshida S, Imaida K.	Characteristics of surfactant proteins in tumorigenic and inflammatory lung lesions in rodents.	J. Toxicol. Pathol.	31(4)	231-240	2018
Toyoda T, <u>Totsuka Y</u> , Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K.	γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from <i>o</i> -toluidine and aniline.	Journal of Applied Toxicology	38	537-543	2018
Fukai, E, Sato, H, Watanabe, M, Nakae, D, <u>Totsuka, Y</u> ,	Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes.	Cancer Sci	109	1024-1031	2018
Tachibana H, <u>Gi M</u> , Kato M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, <u>Wanibuchi H</u> .	Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers.	Cancer Sci	108	331-337	2017

Yamaguchi T, <u>Gi M</u> , Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, <u>Wanibuchi H</u> .	A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks.	Exp Toxicol Pathol	69	1-7	2017
Ishii N, <u>Gi M</u> , Fujioka M, Yamano S, Okumura M, Kakehashi A, <u>Wanibuchi H</u> .	Diphenylarsinic acid exerts promotional effects on hepatobiliary carcinogenesis in a rat medium-term multiorgan carcinogenicity bioassay.	J Toxicol Pathol	30	39-45	2017
Kakehashi A, Stefanov VE, Ishii N, Okuno T, Fujii H, Kawachi K, Kawada N, <u>Wanibuchi H</u> .	Proteome Characteristics of Non-Alcoholic Steatohepatitis Liver Tissue and Associated Hepatocellular Carcinomas.	Int J Mol Sci	18		2017
Doi K, Fujioka M, Sokuza Y, Ohnishi M, <u>Gi M</u> , Takeshita M, Kumada K, Kakehashi A, <u>Wanibuchi H</u> .	Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis.	In Vivo	31	187-197	2017
Yamaguchi T, <u>Gi M</u> , Fujioka M, Doi K, Okuno T, Kakehashi A, <u>Wanibuchi H</u> .	A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 104 weeks.	J Toxicol Sci	42	475-483	2017
Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, <u>Gi M</u> , Fukushima S, <u>Wanibuchi H</u> .	Progression of Hepatic Adenoma to Carcinoma in <i>Ogg1</i> Mutant Mice Induced by Phenobarbital.	Oxid Med Cell Longev	2017	8541064	2017
Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, <u>Gi M</u> , <u>Wanibuchi H</u> .	Enhanced Susceptibility of <i>Ogg1</i> Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis.	Int J Mol Sci	18	pii: E1801	2017

Kataoka H, Miura Y, Kawaguchi M, Suzuki S, Okamoto Y, Ozeki K, Shimura T, Mizoshita T, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Asai K, Joh T.	Expression and subcellular localization of AT motif binding factor 1 in colon tumours.	Mol Med Rep	16	3095-102	2017
Fuji S, Suzuki S, Naito A, Kato H, Hayakawa M, Yamashita Y, Kuno T, Takahashi S.	The NADPH oxidase inhibitor apocynin suppresses preneoplastic liver foci of rats.	Toxicol Pathol	45	544-50	2017
Akagi J, Yokoi M, Choh YM, Toyoda T, Ohmori H, Hanaoka F, Ogawa K.	Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases η , ι and κ to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening.	DNA Repair	61	76-85	2017
Takeshima H, Niwa T, Toyoda T, Wakabayashi M, Yamashita S, Ushijima T.	The degree of methylation burden is determined by the exposure period to carcinogenic factors.	Cancer Sci	108	316-21	2017
Yokohira M, Nakano-Narusawa Y, Yamakawa K, Hashimoto N, Yoshida S, Kanie S, Imaida K.	Validating the use of napsin A as a marker for identifying tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in rodents.	Exp. Toxicol. Pathol.	69(8)	637-642	2017
Kanie S, Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Yoshida S, Hashimoto N, Imaida K.	Suppressive effects of the expectorant drug ambroxol hydrochloride on quartz-induced lung inflammation in F344 rats.	J. Toxicol. Pathol.	30(2)	153-159	2017

Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, <u>Totsuka Y.</u>	Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin.	Genes Environ	39	12	2017
Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, <u>Totsuka Y</u>	Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane.	Mutagenesis	32	455-462	2017