

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

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

(H30-食品-一般-003)

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

令和3年（2021） 5月

## 目 次

I. 総括研究報告書（別添 3）	
香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究	1
国立医薬品食品衛生研究所 副所長 本間 正充	
II. 分担研究報告書（別添 4）	
QSAR と Ames 試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究	1 6
国立医薬品食品衛生研究所 副所長 本間 正充、変異遺伝部 杉山 圭一	
Ames 試験陽性のフォローアップのためのヒト TK6 細胞を用いた TK 遺伝子突然変異アッセイを使用した証拠の重みアプローチ	2 6
国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 安井 学	
AOP と定量的評価を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化	3 8
国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 増村 健一	
Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法による評価	4 5
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 石井 雄二、高須 伸二、西川 秋佳、小川 久美子	
肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価	5 6
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 高須 伸二、石井 雄二、西川 秋佳、小川 久美子	
オルガノイドの調製、オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備	6 7
国立がん研究センター・研究所 今井 俊夫	
オルガノイドの調製	7 3
静岡県立大学 食品栄養環境科学研究所 落合 雅子	
オルガノイド遺伝毒性解析実験に関する研究	7 6
国立がん研究センター・研究所 がんモデル開発部門 戸塚ゆ加里	
オルガノイドを用いる遺伝毒性試験の技術整備	7 9
静岡県立大学 食品栄養科学部 三好 規之	
オルガノイドを用いた新規発がんモデルの作成	8 2
千葉県がんセンター・研究所 筆宝 義隆	
オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備	8 5
岐阜大学 応用生物科学部 平田 暁大	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添 5）	9 2

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

研究代表者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

## 研究要旨

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

## I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

406 物質からなる香料 Ames 試験データベースを完成させるとともに、香料に特化して開発したローカル QSAR モデル (Star Drop) について、学習データの追加等を行い、バージョンアップさせた。他の商業 QSAR モデル (Derek Nexus 及び CASE Ultra) よりも優れたパフォーマンスを示した当該ローカル QSAR モデルは、香料の変異原性の予測に有効である可能性が示された。突然変異試験で相反する結果 (Ames 試験で陽性、げっ歯類発がん性試験で陰性の結果) を持つ 10 種類の化学物質をヒトリンパ芽球 TK6 細胞によるチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験で調べた結果、2 物質が総合判定で陰性であった。トキシコプロテオミクスと組み合わせる TK6 アッセイは、24 時間処理の *in vitro* 特異的反応によって引き起こされた偽陽性の結果を解釈するのに役立つ可能性があり、Ames 試験の偽陽性の減少をもたらすと考えられた。アクリルアミド (AA) をモデル化合物として *gpt delta* マウスを用いたトランスジェニック遺伝子突然変異試験 (TGR 試験) を行った。DNA 付加体形成と遺伝子突然変異誘発が定性的に相関しつつも用量反応性は異なる特徴を示した。AA 発がんのメカニズムは特定の DNA 付加体による遺伝毒性 MoA のみでは十分説明できない可能性が示唆された。レポーター遺伝子の回収効率が高い新規 *gpt delta* ラットは *in vivo* 遺伝子突然変異試験に有用であることが示唆された。香料の安全性評価における *gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験の有用性を検討するため、acetamide の評価を実施した。GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の増加は発がん用量と一致し、本法が発がん性評価に有用であることが確認された。また、肝臓小核試験では発がん用量から小核の形成が認められ、acetamide の発がん性に染色体異常が寄与することを明らかにした。これらの結果は標準プロトコールである 4 週間投与と一致したことから、肝臓小核試験は包括試験への組み込みが可能な有用な手法と考えられた。In silico 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物として 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の *in vivo* 遺伝毒性・発がん性を検討した。F344 *gpt delta* ラットに本剤を 0, 30 または 300 mg/kg/day の用量で 13 週間強制経口投与し、一般毒性ならびに肝臓の遺伝毒性・発がん性を検索した。その結果、一般毒性に関しては体重、鼻腔、肝臓及び脂質代謝に影響

を与える可能性が示唆された。遺伝毒性に関して、肝臓の *gpt* 変異体頻度は有意な高値を示したことから、ラット肝臓において変異原性を示すことが明らかとなった。発がん性に関しては、肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の有意な増加が認められたことから、ラット肝発がん性を有する可能性が示された。また、本試験法は *in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物について、*in vivo* での遺伝毒性や発がん性を検証するための有益なモデルであると考えられた。

## II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究

オルガノイドの施設間輸送については、凍結輸送が安定的であることを確認した。遺伝毒性については、陽性対照物質による変異スペクトルが *in vivo* 試験の結果と矛盾しないことを確認した。発がん性についてはマウス系統差を検討し、肝臓（胆管）オルガノイドでは、陽性対照物質への感受性が *Trp53* ヘテロノックアウトまたは野生型マウスで高かった。動物モデルで低感受性の胃発がんについては、がん関連遺伝子変異と陽性対照物質の組合せによるオルガノイドの発がん促進を確認した。

## 研究分担者

杉山 圭一	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長
安井 学	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
増村健一	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
石井雄二	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長
高須伸二	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官
小川久美子	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長
西川秋佳	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 客員研究員
今井俊夫	国立がん研究センター・研究所 動物実験部門長
落合雅子	静岡県立大学 客員共同研究員
戸塚ゆ加里	国立がん研究センター・研究所 がんモデル開発部門ユニット長
三好規之	静岡県立大学 食品栄養科学部 准教授
筆宝義隆	千葉県がんセンター・研究所 発がん制御研究部長
平田暁大	岐阜大学 応用生物化学科 助教

### A. 研究目的

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

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

本研究班は上記の目的を達成するため、以下の研究に取り組んだ。

#### I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

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

今年度は新たに追加実施した分も加え、国衛研変異遺伝部が実施した香料の Ames 試験結果をまとめ、データを再評価して、小野らの香料 Ames 試験データベースの更新と堅牢化を図ることとした。また、国衛研変異遺伝部にて取得した香料の Ames 試験結果を追加学習データとして取り入れ、StarDrop QSAR モデルをバージョンアップすると同時に、更新した上記の香料 Ames 試験データベースに対する予測性能を代表的な商業 QSAR モデルと比較することも目的とした。

##### 2) Ames 試験陽性のフォローアップのためのヒト TK6 細胞を用いた TK 遺伝子突然変異アッセイを使用した証拠の重みアプローチ (安井) :

細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験) と哺乳類の発がん性試験の間で矛盾する結果は、代謝、ゲノム構造、および DNA 修復システムによる種の違いが原因である可能性がある。本研究では、OECD ガイドライン TG490 で確立されたヒトリンパ芽球 TK6 細胞を用いるチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験 (TK6 アッセイ) を使用して、突然変異試験で相反する結果 (Ames 試験で陽性、げっ歯類発がん性試験で陰性の結果) を持つ 10 種類の化学物質を調べ、フォローアップ試験としての TK6 アッセイの有用性を明らかに

することを目的とする。

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

OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法 (AOP)」を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。分子的初期イベントである DNA 初期損傷 (DNA 付加体形成) とこれに続くキーイベントである遺伝子突然変異誘発に関して、*in vivo* における量的相関性を調べる。既存の *gpt delta* ラット試験系のコストが高い欠点を改善するため、レポーター遺伝子の回収効率を高めた新規 *gpt delta* ラットの作出と評価を行う。

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

レポーター遺伝子導入動物を用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験による acetamide の評価を行うことで、本法の有用性を検討した。また、新たに *in vivo* での染色体異常を検出する肝臓小核試験を実施し、その有用性を検討した。

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

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

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

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

## **B. 研究方法**

### I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

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

Ames 試験を実施するとともに、香料の Ames 試験データベースの拡充と堅牢化を進めた。また、QSAR の統合ソフトであり、構成するモジュールの一つである Auto-Modeller™を用いて、機械学習による独自の統計ベース QSAR モデルを開発した。

#### 2) Ames 試験陽性のフォローアップのためのヒト TK6 細胞を用いた TK 遺伝子突然変異アッセイを使用した証拠の重みアプローチ (安井) :

日本の 10 研究所との共同研究で、Ames 試験陽性である 10 個の非発がん性化学物質を用いて、TK6 アッセイを実施した。アッセイは、短時間処理 (ラット肝臓 S9 の存在下および非存在下で 4 時間) および連続処理 (S9 の非存在下で 24 時間) の処理方法で実施された。さらに、トキシコプロテオミクス分析と TK6 アッセイの統合を検討した。

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

雄 *gpt delta* マウスに AA を 28 日間飲水投与して最終投与 3 日後に組織を採取した。肝臓、肺、

精巢の DNA 付加体量と *gpt* 遺伝子突然変異体頻度を測定して用量反応データを取得し、ベンチマークドーズ法により PoD を算出した。 $\lambda$  EG10 をホモに持った新規 *gpt delta* ラット (Wistar Hannover) に BaP, ENU を投与し、突然変異頻度の測定と変異スペクトルの解析を行った。

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

Acetamide を 0.6、1.25 及び 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与した F344 系 *gpt delta* ラットについて、免疫組織化学染色法による GST-P 陽性細胞巢の検索により肝発がん性評価を実施した。また、遺伝毒性評価として発がん標的臓器である肝臓について小核試験を実施した。さらに、肝臓小核試験の標準プロトコールに従い、acetamide を F344 ラットに 0.6、1.25 及び 2.5% の濃度で 4 週間混餌投与し肝臓及び骨髄小核試験を実施した。検出された大型の小核について FISH 法による染色体の検索を実施した。

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

6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 0、30 または 300 mg/kg の用量で 1 日 1 回 13 週間強制経口投与し、一般毒性評価ならびに肝臓を対象とした遺伝毒性・発がん性の検索を実施した。遺伝毒性評価では肝臓について *gpt assay* による検索を、発がん性評価では肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による検索を実施した。

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

オルガノイドは、基幹機関で調製したものを各分担研究者に送付した。遺伝毒性については *gpt delta* マウス由来の肺オルガノイドを用いて、アクリルアミド (AA) による変異頻度の上昇に対する変異スペクトルの解析を行った。発がん性については C57BL 背景の *Trp53* ホモ/ヘテロ欠失

と野生型マウスの肺および肝臓 (胆管) からオルガノイドを調製し、メチルニトロソ尿素 (MNU) とアセトアミドの低・高濃度で処置し、ヌードマウス皮下に移植して病理組織学的に評価した。胃については、*Trp53* 欠失、*Trp53/Apc* 二重欠失オルガノイドに対する 7,12-ジメチルメنز[a]アントラセン (DMBA) の影響を解析した。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

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

香料の Ames 試験データベースに関しては、各種データベースについて内容を精査した上でキュレーションを行なった。香料に特化した StarDrop QSAR モデルのバージョンアップ及び他の商業 QSAR モデルとの予測性能の比較に関しては、開発したローカル QSAR モデル (Star Drop) は他の商業 QSAR モデル (Derek Nexus 及び CASE Ultra) よりも感度・特異度・正確度のいずれにおいても優れたパフォーマンスを示すことを明らかにした。

#### 2) Ames 試験陽性のフォローアップのためのヒト TK6 細胞を用いた TK 遺伝子突然変異アッセイを使用した証拠の重みアプローチ (安井) :

10 物質中 2 物質が総合判定で陰性であった (フォローアップ試験として 20% 有効)。8 つの陽性物質のうち 3 つは、S9 無しの同一の処理条件にもかかわらず、興味深いことに短時間処理後に陰性、24 時間処理後に陽性であった。そこで、その

うちの1物質である4-ニトロアントラニル酸で処理されたTK6細胞のトキシコプロテオミクスを行い、試験結果の解釈を考察した。24時間処理後に発現差のあるタンパク質群（DEP）を使用した生物情報分析は、*in vitro* 特異的酸化ストレスがTK6アッセイにおける偽陽性応答に関与していることを示した。

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

DNA付加体量は用量依存的に直線的な増加を示した。変異頻度は陰性対照群と比較して有意に増加したが、100, 300 ppm投与群では頭打ちの傾向を示した。BMD信頼区間（BMDL-BMDU）は付加体量、変異頻度、発がん概ね重なっていたが、変異頻度についてはBMDL値が極端に低くPoDの妥当性には疑問がある。新規*gpt delta rat (homo)*にBaPとENUを投与し、*gpt*突然変異体頻度の有意な増加と、特徴的な塩基置換変異の誘発を確認した。トランスジーンλEG10がラット1番染色体にマルチコピーで導入されていることを示した。

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

肝臓におけるGST-P陽性細胞巢の数及び面積は発がん用量の1.25%から有意に増加した。肝臓小核試験の結果、主核の1/4以下の通常の小核に加え、1/2～1/4程の大型の小核が検出され、どちらも1.25%から有意に増加した。肝臓小核試験の標準プロトコールである4週間投与における肝臓小核試験でも同様の傾向が認められ、骨髄小核試験は陰性だった。なお、小核の頻度は13週間投与に比して4週間投与のラットで高値を示した。FISH法による検索の結果、大型の小核に染色体が含まれることを確認した。

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

300 mg/kg/day投与群において投与1週目から2週目に鼻出血がみられ、全試験期間を通じて統計学的に有意な体重増加抑制が認められた。血清生

化学検査の結果、30 mg/kg/day以上の投与群において総蛋白、トリグリセリド、総コレステロール、リン脂質の有意な低値が認められた。300 mg/kg/day投与群の肝臓の絶対および相対重量はいずれも有意な高値を示し、病理組織学的には小葉中心性肝細胞肥大、鼻腔嗅上皮の変性/壊死および呼吸上皮化生が認められた。300 mg/kg/day投与群の*gpt*変異体頻度は対照群に比して有意な高値を示した。また、300 mg/kg/day投与群のGST-P陽性細胞巢の数および面積において有意な増加が認められた。

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

オルガノイドの凍結輸送が安定的であることを確認した。遺伝毒性については、*gpt delta*マウス由来の肺オルガノイドに誘発されたAAの変異スペクトルが*in vivo*試験の結果と矛盾しないことを示した。発がん性に対する高感受性を期待した*Trp53*ホモ欠失マウス由来のオルガノイドでは、MNU、アセトアミドともに影響を示さず、野生型と*Trp53*ヘテロ欠失マウス由来の特に肝臓（胆管）オルガノイドを用いることで、ヌードマウス皮下にて発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性（一部微小がん）が誘発された。胃オルガノイドでは、*Trp53/Apc*二重欠失オルガノイドにDMBAを組合せることで発がんを促進した。

## D. 考 察

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

今後、開発したモデルが示す偽陰性予測物質と偽陽性予測物質に関するデータを取り込むことで、StarDrop QSARモデルの特異性が向上する可能性がある。このような予測性能向上への取り組みを継続することによって、実試験実施と遜色ない結果予測が可能になると考えられる。

酸化ストレスは、*in vitro*での特異的な遺伝毒性メカニズムのひとつと考えられる。一般的



に、*in vivo*での哺乳動物組織は、培養中の細胞よりも優れた抗酸化防御を示す可能性が高い。このような場合、活性酸素種の生成を介して遺伝毒性を誘発する化学物質は、DNAに直接損傷を与えるが、閾値があると予想される (Kirkland *et al.*, *Mutagenesis* 22, 161-75 (2007))。本研究で見出された酸化ストレスに関与する DEP は、同様に矛盾する試験結果を持つ他の化学物質で、DEP が観察されるかどうかを確認するために、さらなる研究解析が必要である。同じ特徴が観察された場合、これらのタンパク質 (または遺伝子) または活性酸素種の定量化は、作用機序 (MOA) の観点から *in vitro*での特異的陽性結果を識別するための有望な解決策を提供できると考えられる。

遺伝毒性発がん AOP において、DNA 付加体形成と遺伝子突然変異誘発が定性的に相関する一方で、用量反応性が異なる特徴を示す場合があることが示唆された。一方で、発がん標的組織において用量依存的な発がんがみられることから、AA 発がんのメカニズムは特定の DNA 付加体による遺伝毒性 MoA のみでは十分説明できない可能性が示唆された。λ EG10 がホモに導入された新規 *gpt delta* ラット (homo) は変異原が誘発する点突然変異の検出が可能であり *in vivo* 遺伝子突然変異試験に有用であることが示唆された。

一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験による acetamide の評価において、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の増加は発がん用量と一致したことから、本法が包括試験における肝発がん性評価に有効であることを確認した。肝臓小核試験の結果から、acetamide は肝臓において選択的に染色体異常を引き起こす異数性誘発物質と考えられ、その染色体異常が肝発がんに寄与していると考えられた。一方、投与期間の延長によりわずかに検出感度の低下が認められたものの、肝臓小核試験の包括試験への組み込みは可能と考えられた。

3-acetyl-2,5-dimethylfuran については、一般

毒性検索の結果、300 mg/kg/day 投与群において鼻出血、鼻腔嗅上皮の変性、呼吸上皮化成分が認められたことから、高用量において鼻腔嗅上皮を毒性標的とすることが明らかとなった。また、肝重量増加および小葉中心性肝細胞肥大が認められ、血清中のトリグリセリド、総コレステロール、リン脂質は用量依存的に低下したことから、肝臓および脂質代謝に影響を与える可能性が考えられた。遺伝毒性に関して、肝臓における *gpt* 変異体頻度は有意な高値を示したことから、ラット肝臓において変異原性を示すことが明らかとなった。さらに、GST-P 陽性細胞巢の有意な増加が認められたことから、肝発がん性を有する可能性が示された。また、本試験法は遺伝毒性が疑われる化合物について *in vivo* で検証するための有益なモデルであると考えられた。

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

オルガノイド系を用いる試験系は、基幹施設でのバンク化と多施設への安定的輸送により普及可能であると考えられた。*gpt delta* マウス由来のオルガノイドは、既存の *in vitro* 試験法を補完する発がん性予測試験に適用可能であることが示唆された。発がん性試験法としての条件設定に関して、肝臓 (胆管) オルガノイドは、*Trp53* ヘテロノックアウトまたは野生型マウスで高感受性であったが、肺オルガノイドについてはマウスの背景系統についての課題が残った。動物モデルで低感受性の胃発がんについては、がん関連遺伝子変異と陽性対照物質の組合せによるオルガノイドの発がん促進を確認し、その有用性が示された。

## **E. 結 論**

### I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

香料 Ames 試験データベースを構築しつつ、商業モデルよりも優れた予測性を示す可能性のあるローカル QSAR モデルを開発した。プロテオミク

ス技術と TK6 アッセイの統合は、24 時間処理特異的な陽性における結果の解釈に寄与する可能性があり、Ames 試験のフォローアップにおいて偽陽性をさらに減少させることにつながると考えられた。AA 投与 *gpt delta* マウスの肝臓における *gpt* 突然変異体頻度は有意に増加したが、DNA 付加体量および発がんとの用量相関性は異なり、AA 発がんメカニズムは特定の DNA 付加体による遺伝毒性 MoA のみでは十分説明できない可能性が示唆された。TGR 試験の効率化のため、従来の系統と比べてレポーター遺伝子回収効率が高い新規 *gpt delta* ラット (homo) を作出し、*in vivo* 遺伝毒性試験に有用であることを示した。Acetamide の肝発がん性には、肝臓選択的に生じる染色体異常が寄与すると考えられた。また、包括試験により化学物質の発がん性評価も可能であることを確認した。さらに、肝臓小核試験の包括試験への組み込みは、*in vivo* における変異原性に加え染色体異常の評価を可能にする有用な手段と考えられた。3-acetyl-2,5-dimethylfuran の *in vivo* 遺伝毒性・発がん性を検討した結果、一般毒性に関しては体重、鼻腔、肝臓及び脂質代謝に影響を与える可能性が示唆された。遺伝毒性に関して、ラット肝臓において変異原性を示すことが明らかとなった。肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の有意な増加が認められたことから、ラット肝発がん性を有する可能性が示された。

## II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究

オルガノイドの施設間輸送については、凍結輸送が安定的であることを確認した。遺伝毒性については、陽性対照物質による変異スペクトルが *in vivo* 試験の結果と矛盾しないことを確認した。発がん性についてはマウス系統差を検討し、肝臓 (胆管) オルガノイドでは、陽性対照物質への感受性が *Trp53* ヘテロノックアウトまたは野生型マウスで高かった。動物モデルで低感受性の胃発がんについては、がん関連遺伝子変異と陽性対照物質の組合せによるオルガノイドの発がん促進を確認した。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 誌上発表

1. Honma M, Kitazawa A, Kasamatsu T, Sugiyama KI. Screening for Ames mutagenicity of food flavor chemicals by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes and Environment* 2020 42:32.
2. Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama KI, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M. Development of a new quantitative structure-activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ Auto-Modeller™. *Genes and Environment* 2021 43:16.
3. Yasui M, Fukuda T, Ukai A, Maniwa J, Imamura T, Hashizume T, Yamamoto H, Shibuya K, Narumi K, Fujiishi Y, Okada E, Fujishima S, Yamamoto M, Otani N, Nakamura M, Nishimura R, Ueda M, Mishima M, Matsuzaki K, Takeiri A, Tanaka K, Okada Y, Nakagawa M, Hamada S, Kajikawa A, Honda H, Adachi J, Misaki K, Ogawa K, Honma M. ; Weight of evidence approach using a TK gene mutation assay with human TK6 cells for follow-up of positive results in Ames tests: a collaborative study by MMS/JEMS. *Genes Environ.* 43(1):7 (2021).
4. Masumura K, Yatagai F, Ochiai M, Nakagama H, Nohmi T. Effects of the *scid* mutation on X-ray-induced deletions in the brain and spleen of *gpt delta* mice. *Genes*

- Environ. 2020;42:19.
5. Chen R, You X, Cao Y, Masumura K, Ando T, Hamada S, Horibata K, Wan J, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y. Benchmark dose analysis of multiple genotoxicity endpoints in *gpt* delta mice exposed to aristolochic acid I. *Mutagenesis*. 2020;geaa034.
  6. Ishii Y, Takasu S, Grúz P, Masumura K, Ogawa K, Nohmi T, Umemura T. The role of DNA polymerase  $\zeta$  in benzo[*a*]pyrene-induced mutagenesis in the mouse lung. *Mutagenesis*. 2021;geab007.
  7. Hagio S, Tsuji N, Furukawa S, Takeuchi K, Hayashi S, Kuroda Y, Honma M, Masumura K. Effect of sampling time on somatic and germ cell mutations induced by acrylamide in *gpt* delta mice. *Genes Environ*. 2021;43:4.
  8. Nakamura K, Ishii Y, Takasu S, Nohmi T, Shibutani M, Ogawa K. Lack of *in vivo* mutagenicity of acetamide in a 13-week comprehensive toxicity study using F344 *gpt* delta rats. *Toxicol. Sci.* 177, 431-440 (2020).
  9. Matsuura, T., Maru, Y., Izumiya, M., Hoshi, D., Kato, S., Ochiai, M., Hori, M., Yamamoto, S., Tasuno, K., Imai, T., Aburatani, H., Nakajima, A., Hippo, Y.: Organoid-based *ex vivo* reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 41, 490-501 (2020)
  10. Naruse, M., Masui, R., Ochiai, M., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T. An organoid-based carcinogenesis model induced by *in vitro* chemical treatment. *Carcinogenesis* 41, 1444-1453 (2020)
  11. Naruse, M., Ochiai, M., Sekine, S., Taniguchi, H., Yoshida, T., Ichikawa, H., Sakamoto, H., Kubo, T., Matsumoto, K., Ochiai, A., Imai, T. Re-expression of *REG* family and *DUOXs* genes in CRC organoids by co-culturing with CAFs. *Sci. Rep.* 11:2077 (2021)
  12. Yagishita, S., Kato, K., Takahashi, M., Imai, T., Yatabe, Y., Kuwata, T., Suzuki, M., Ochiai, A., Ohtsu, A., Shimada, K., Nishida, T., Hamada, A., Mano, H. Characterization of the large-scale Japanese patient-derived xenograft (J-PDX) library. *Cancer Sci.* (In press)
  13. Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabenjakul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I. (2021) U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, *Virology*, 555, 71-77.
  14. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. (2021) New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.*, 112, 7-15.
  15. Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H. (2020) Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 96, 180-187.
  16. Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. (2020) Novel

- o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 33, 1907-1914.
17. Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. (2020) Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ.* 42, 16.
  18. 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. (2020) Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis.* 41, 368-376.
  19. Zhou T, Hirayama Y, Tsunematsu Y, Suzuki N, Tanaka S, Uchiyama N, Goda Y, Yoshikawa Y, Iwashita Y, Sato M, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K. Isolation of new colibactin metabolites from wild-type *Escherichia coli* and *in situ* trapping of a mature colibactin derivative. *J. Am. Chem. Soc.*, (2021) in press.
  20. Matsuyama H, Tanaka W, Miyoshi N, Miyazaki T, Michimoto H, Sakakibara H. Beneficial effects of the consumption of sun-dried radishes (*Raphanus sativus* cv. YR-Hyuga-Risou) on dyslipidemia in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Food Biochem.*, (2021) in press.
  21. Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. *o*-anisidine dimer, 2-methoxy-*N*-(2-methoxyphenyl) benzene-1,4-diamine, in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, (2021) 34, 912-919.
  22. Numata M, Hirano A, Yamamoto Y, Yasuda M, Miura N, Sayama K, Shibata MA, Asai T, Oku N, Miyoshi N, Shimoi K. Metastasis of breast cancer promoted by circadian rhythm disruption due to light/dark shift and its prevention by dietary quercetin in mice. *J. Circadian Rhythms*, (2021) 19, 1-13.
  23. Yamamoto S, Kato S, Senoo N, Miyoshi N, Morita A, Miura S. The difference of phosphatidylcholine profile and identification of characteristic phosphatidylcholine molecules in meat animal species and meat cut locations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2021) in press.
  24. Hayakawa S, Ohishi T, Miyoshi N, Oishi Y, Nakamura Y, Isemura M. Anti-cancer Effects of Green Tea Epigallocatechin-3-gallate and Coffee Chlorogenic Acid. (Review) *Molecules*, (2020) 25, 4553.
  25. Watanabe D, Murakami H, Ohno H, Tanisawa K, Konishi K, Tsunematsu Y, Sato M, Miyoshi N, Wakabayashi K, Watanabe K, Miyachi M. Association between dietary intake and the prevalence of tumorigenic bacteria in the gut microbiota of middle-aged Japanese adults. *Sci. Rep.*, (2020) 10, 15221.
  26. Kato Y, Kishi Y, Okano Y, Kawai M, Shismizu M, Suga N, Yakemoto C, Kato M, Nagata A, Miyoshi N. Methylglyoxal binds to amines in honey matrix and 2'-methoxyacetophenone is released in

- gaseous form into headspace on heating of manuka honey. *Food Chemistry*, (2020) 337, 127789.
27. Senoo N, Miyoshi N, Kobayashi E, Morita A, Tanihata J, Takeda S, Miura S. Glycerophospholipid profile alterations are associated with murine muscle-wasting phenotype. *Muscle Nerve.*, (2020) 62, 413-418.
  28. Miyoshi N, Tanabe H, Suzuki T, Saeki K, Hara Y. Applications of a standardized green tea catechin preparation for viral warts and human papilloma virus-related and unrelated cancers. (Review) *Molecules*, (2020) 25, 2588.
  29. Yoshikawa Y, Tsunematsu Y, Matsuzaki N, Hirayama Y, Higashiguchi F, Sato M, Iwashita Y, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K. Characterization of colibactin-producing *Escherichia coli* isolated from Japanese patients with colorectal cancer. *Jpn. J. Infect. Dis.*, (2020) 73, 437-442.
  30. Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel *o*-toluidine metabolite in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, (2020) 33, 1907-1914.
  31. Sanada S, Suzuki T, Nagata A, Hashidume T, Yoshikawa Y, Miyoshi N. Intestinal microbial metabolite stercobilin involvement in the chronic inflammation of *ob/ob* mice. *Sci. Rep.*, (2020) 10, 6479.
  32. Shimba Y, Katayama K, Miyoshi N, Ikeda M, Morita A, Miura S.  $\beta$ -aminoisobutyric acid suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Biol. Pharm. Bull.*, (2020) 43, 1016-1019.
  33. Matsuzaki K, Iwai K, Yoshikawa Y, Shimamura Y, Miyoshi N, Hiramoto S, Asada K, Fukutomi R, Su H, Ohashi N. Wheat bran intake enhances to secrete bacteria-binding IgA into a lumen of the intestinal tract by the increment of short chain fatty acid production through the modulation of gut microbiota. *Nat. Prod. Commun.*, (2020) 15, 1934578X2091779.
  34. Uchikawa M, Kato M, Nagata A, Sanada S, Yoshikawa Y, Tsunematsu Y, Sato M, Suzuki T, Hashidume T, Watanabe K, Yoshikawa Y, Miyoshi N. Elevated levels of proinflammatory volatile metabolites in feces of high fat diet fed KK-Ay mice. *Sci. Rep.*, (2020) 10, 5681.
  35. Kawanishi M, Shimohara C, Oda Y, Hisatomi Y, Tsunematsu Y, Sato M, Hirayama Y, Miyoshi N, Iwashita Y, Yoshikawa Y, Sugimura H, Mutoh M, Ishikawa H, Wakabayashi K, Yagi T, Watanabe K. Genotyping of a gene cluster for production of colibactin and *in vitro* genotoxicity analysis of *Escherichia coli* strains obtained from the Japan Collection of Microorganisms. *Genes and Environment*, (2020) 42, 11.
  36. Sarmale-Murga C, Akaoka F, Sato M, Takanishi J, Mino T, Miyoshi N, Watanabe K. A new class of dimeric product isolated from the fungus *Chaetomium globosum*: Evaluation of chemical structure and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*, (2020) 73, 320-323.
  37. Kondo T, Saigo S, Ugawa S, Kato M, Yoshikawa Y, Miyoshi N, Tanabe K. Prebiotic effect of fructooligosaccharides on the inner ear of DBA/2J mice with

- early-onset progressive hearing loss. *J. Nutr. Biochem.*, (2020) 75, 108247.
38. Ebisawa K, Sugiyama T, Itami M, Maru Y, Hippo Y, Tanaka N. A case of cervical clear cell carcinoma with serous component. *J Obstet Gynaecol Res.* 2021 doi: 10.1111/jog.14794. Epub ahead of print. PMID: 33870616.
  39. Kato S, Fushimi K, Yabuki Y, Maru Y, Hasegawa S, Matsuura T, Kurotaki D, Suzuki A, Kobayashi N, Yoneda M, Higurashi T, Enaka M, Tamura T, Hippo Y\*, Nakajima A. Precision modeling of gall bladder cancer patients in mice based on orthotopic implantation of organoid-derived tumor buds. *Oncogenesis* 10:33. 2021
  40. Arioka Y, Hirata A, Kushima I, Aleksic B, Mori D, Ozaki N. Characterization of a schizophrenia patient with a rare *RELN* deletion by combining genomic and patient-derived cell analyses. *Schizophrenia Res.* 216:511-515, 2020
  41. Ishida K, Tomita H, Kanayama T, Noguchi K, Niwa A, Kawaguchi M, Miyai M, Matsuo M, Imaizumi Y, Nakashima T, Kato K, Hatano Y, Hirata A, Okada H, Shibata T, Hara A. Specific deletion of p16<sup>INK4a</sup> with retention of p19<sup>ARF</sup> enhances the development of invasive oral squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 190: 1332-1342, 2020
  42. Tashita C, Hoshi M, Hirata A, Kubo H, Nakamoto K, Hattori T, Yamamoto Y, Tomita H, Hara A, and Saito K. Kynurenine Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate-Induced Colitis in Mice. *World J. Gastroenterol.* 7;26(9):918-932. 2020
  43. Kurihara T, Hirata A, Yamaguchi T, Okada H, Kameda M, Sakai H, Haridy M, Yanai T. Avipoxvirus infection in two captive Japanese cormorants (*Phalacrocorax capillatus*). *J. Vet. Med. Sci.* 82(6) :817-822, 2020
  44. Yamazaki A, Nakamura T, Miyabe-Nishiwaki T, Hirata A, Inoue R, Kobayashi K, Miyazaki Y, Hamasaki Y, Ishigami A, Nagata N, Kaneko A, Koizumi M, Ohta H, Okano HJ, Murata T. The production profile of lipid metabolites in urine of marmoset with wasting syndrome. *PLoS One* 15(6): e0234634, 2020
  45. Yoshizaki K, Hirata A, Nishii N, Kawabe M, Goto M, Mori T, and Sakai H. Familial Adenomatous Polyposis in Dogs: Hereditary Gastrointestinal Polyposis in Jack Russell Terriers with Germline *APC* Mutations. *Carcinogenesis*, 42(1), 70-79, 2021
  46. Miyai M, Kanayama T, Hyodo F, Kinoshita T, Ishihara T, Okada H, Suzuki H, Takashima S, Wu Z, Hatano Y, Egashira Y, Enomoto Y, Nakayama N, Soeda A, Yano H, Hirata A, Niwa M, Sugie S, Mori T, Maekawa Y, Iwama T, Matsuo M, Hara A, Tomita H. Glucose transporter Glut1 controls diffuse invasion phenotype with perineuronal satellitosis in diffuse glioma microenvironment. *Neurooncol.* Adv.3(1):1-15, 2021
  47. Yoshizaki K, Hirata A, Matsushita H, Nishii N, Kawabe M, Mori T, and Sakai H. PCR-based Genotyping Assays to Detect Germline *APC* Variant Associated with Hereditary Gastrointestinal Polyposis in Jack Russell Terriers. *BMC Vet. Res.* 17(1):32, 2021
  48. Tomita H, Tanaka K, Hirata A, Okada H, Imai H, Shirakami Y, Onishi K, Sugie S,

- Aoki H, Hatano Y, Noguchi K, Kanayama T, Niwa A, Suzui N, Miyazaki T, Tanaka T, Akiyama H, Shimizu M, Yoshida K, and Hara A. Inhibition of FGF10–ERK signal activation suppresses intraductal papillary neoplasm of the bile duct and its associated carcinomas. *Cell Rep.* 34(8):108772, 2021
49. Goto M, Hirata A, Murakami M, Minami N, and Sakai H. What's your diagnosis? Subcutaneous mass on the head of a dog. *Vet. Clin. Pathol.* in press.

#### 学会発表

1. 本間正充：生活環境で極低レベルで摂取する遺伝毒性発がん物質の安全性評価と管理、日本環境変異原学会第49回大会（2020.11）
2. 安井 学, 鶴飼明子, 本田大士, 山田雅巳, 鈴木孝昌; ヒト肝及びラット肝 S9 の比較プロテオーム解析. 日本環境変異原学会第49回大会(2020.11.27)
3. 福田隆之, 鶴飼明子, 西村諒一, 中村真生, 佐々 彰, 安井 学; TK6 細胞を用いた *in vitro* 小核試験結果におけるMGMT 遺伝子発現の役割. 日本環境変異原学会第49回大会(2020.11.27)
4. 増村健一, 安東朋子, 鶴飼明子, 藤原聖, 横瀬重雄, 高木久宜, 能美健彦, 本間正充：遺伝子突然変異試験において高いレポーター遺伝子回収効率を実現する新規 *gpt delta* ラット. 第79回日本癌学会学術総会(2020.10)
5. 増村健一, 安東朋子, 石井雄二, 杉山圭一, 本間正充：アクリルアミド投与 *gpt delta* マウスを用いた DNA 付加体と点突然変異の用量相関に関する研究. 日本環境変異原学会第49回大会（2020.11）
6. 中村賢志, 石井雄二, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「Acetamide のラット肝発がん過程における染色体異常及び DNA 損傷の関与」第47回日本毒性学会学術年会（2020年6月）
7. 中村賢志, 石井雄二, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「染色体異常により誘発される小核形成を介した acetamide の肝発がん機序の検討」日本環境変異原学会第49回大会（2020年11月）
8. 中村賢志, 石井雄二, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「染色体異常を起点とする acetamide の肝発がん機序の検討」第37回日本毒性病理学会学術集会（2021年2月）
9. 今井俊夫, 町田雪乃, 成瀬美衣：マウス正常乳腺組織由来オルガノイドの特性. 第37回日本毒性病理学会学術総会（2021年1月）
10. 小宮雅美, 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79回日本癌学会学術総会（2020年10月）
11. 成瀬美衣, 落合雅子, 落合淳志, 今井俊夫：大腸がんオルガノイドと CAF の共培養により REG family や dual oxidase genes の遺伝子発現が誘導される. 第79回日本癌学会学術総会（2020年10月）
12. 戸塚ゆ加里: NGS によるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望 第47回日本毒性学会学術年会シンポジウム(2020年6月)
13. 戸塚ゆ加里: 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 がん予防学術大会(2020年9月)
14. 戸塚ゆ加里: Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach 第79回癌学会（2020年10月）
15. 戸塚ゆ加里: 集学的アプローチによりがんの要因を解明する 第2回 三陸包括的緩和医療研究会(2020年10月)
16. 戸塚ゆ加里: 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第49回 環境変異原学会(2020年9月)
17. 戸塚ゆ加里: 発がん性評価法としての DNA アダクトーム解析の展望 第37回 日本毒性病

理学会(2021年1月)

18. 戸塚ゆ加里:発がん性評価法としての DNA アダクトーム解析の展望 第12回 JBFシンポジウム(2021年3月)
19. 市田日和、梅林脩平、赤堀拓、妹尾奈波、佐藤友紀、三好規之、吉田卓矢、守田昭仁、杉浦悠毅、井上菜穂子、川名裕己、青木淳賢、藤井宣晴、眞鍋康子、亀井康富、三浦進司: LPGAT1 が筋線維タイプにおけるリン脂質クオリティと機能の相違を生み出す、第62回日本脂質生化学会(東京)、2020年5/14-15
20. 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之:  $\alpha$ -Anisidine 曝露ラット尿中代謝物の探索、日本環境変異原学会 第49回大会(沼津・オンライン)、2020年11/26-27
21. 植嶋亜衣、久富優太、小田美光、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、八木孝司、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜: 日本人 大腸がん患者から単離したコリバクチン産生大腸菌による小核誘導と遺伝毒性機構の解析、日本環境変異原学会 第49回大会(沼津・オンライン)、2020年11/26-27
22. 川西優喜、小田美光、久富優太、植嶋亜衣、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、八木孝司、若林敬二、渡辺賢二: 腸内細菌が産生する変異原物質コリバクチン、日本環境変異原学会 第49回大会(沼津・オンライン)、2020年11/26-27
23. 松山弘希、田中航、三好規之、宮崎達雄、道本英之、榊原啓之: 天日干しおよび生ダイコン摂取の血中トリグセド低下効果、JSOFF(宮崎・オンライン)、2020年11/28-29
24. 小林琢磨、塩地雄大、吉田卓矢、小田切友佳、笹田達也、三好規之: スピルリナ摂取ラットにおけるタンパク質消化吸収・生体利用解析、日本農芸化学会 2021(仙台・オンライン)、2021年3/18-21
25. 松田真弥、恒松雄太、尾形勇二、蜂矢 志保実、岸本真治、三好規之、渡辺賢二: ヒト培養細胞を宿主とした抗生物質の生産、日本農芸化学会 2021(仙台・オンライン)、2021年3/18-21
26. 丸喜明、筆宝義隆: 婦人科がん研究における患者由来オルガノイドの活用、第24回日本がん分子標的治療学会(オンライン)2020年10月6-8日【ベストポスター賞】
27. 筆宝義隆: オルガノイド培養技術の婦人科がん領域への応用、第21回日本再生医療学会総会(オンライン)2021年3月11-13日
28. 筆宝義隆、丸喜明、田中尚武: 患者由来オルガノイドの婦人科正常組織および腫瘍性病変の研究への利用、第79回日本癌学会学術総会(広島)2020年10月1-3日
29. 丸喜明、筆宝義隆: オルガノイド発がんモデルが明らかにする子宮内膜の発がんおよび転移促進的な遺伝学的相互作用、第79回日本癌学会学術総会(オンライン)2020年10月1-3日
30. 筆宝義隆: オルガノイドを用いた ex vivo 発がんモデルの確立とがん予防への応用、第27回日本がん予防学会総会(オンライン)2020年9月15-16日
31. 筆宝義隆: マウスおよび患者由来のがんオルガノイドモデル確立と創薬への応用、日本学術会議シンポジウム(オンライン)「創薬を加速させる革新的な細胞・臓器・個体モデル」、2021年1月18日
32. 筆宝義隆: 3次元オルガノイド培養を用いたがんの本態解明と個別化医療・創薬への応用、(株)情報機構 細胞培養セミナー(オンライン)2020年12月3日
33. 筆宝義隆: 婦人科領域における患者由来オルガノイド研究の新展開、第4回患者由来がんモデル講演会(オンライン)2020年10月29-30日
34. 星 大輔、喜多 絵美里、丸 喜明、筆宝 義隆: ヒト膵腺房細胞癌株の樹立と解析患者由来がんモデル講演会(オンライン)2020年10月29-30



日

35. 入澤祐太、平田暁大、酒井洋樹、今井俊夫:アクリルアミド暴露後の肺オルガノイドの病理組織学的変化. 第 37 回日本毒性病理学会 (2021 年 1 月)

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

特になし

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)  
分担研究報告書

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

分担研究課題名：QSARとAmes試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究

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

#### 研究要旨

本分担研究の最終年度として、香料の Ames 試験データについて、国衛研変異遺伝部にて新たに実施した試験も含め、データの追加、再評価を行い、406 物質からなる香料 Ames 試験データベースを完成させた。

また香料に特化して開発したローカル QSAR モデル (Star Drop) について、学習データの追加等を行い、バージョンアップさせた。この QSAR モデル (StarDrop NIHS 834\_67) の予測精度を、上記の香料 Ames 試験データベースに対して検証したところ、感度 79.5%、特異度 96.4%、正確度 94.6%と、他の商業 QSAR モデル (Derek Nexus 及び CASE Ultra) よりも優れたパフォーマンスを示した。このことは学習アプローチの工夫や対象ケミカルスペースの絞り込みが有効であったと考えられる。偽陽性や偽陰性結果の分析等を通じてさらなる改善を行うことにより、実試験に依らない評価を実現できる可能性が示された。

#### A. 研究目的

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

78品目が分離指定されている。一方、米国では2,200品目、欧州では2,700品目の香料が使用されているが、世界で共通に使用されている香料は1,550品目に過ぎない。香料の安全性評価に各国の相違があることに原因の一つがあるが、早期の国際的調和が望まれる。

香料は、一般に数十から数百種類混合して用いられることが多いが、個々の香料の食品への添加量は数pptから数ppmレベルで有り、過剰摂取は考えられないことから、一

般毒性の懸念は少なく、問題となる毒性は変異原性である。変異原性はがんの原因であり、DNAに損傷を与え、突然変異を誘発し、その作用には、閾値がないと考えられている。従って、変異原性のある化学物質の摂取は、それがたとえ微量であっても、発がんリスクはゼロにはならないため厳しい管理が要求される。JECFAでは変異原性を含まないか、なる毒性であっても、その曝露レベルがTTC（毒性学的閾値の懸念の閾値）以下であれば安全性に問題ないとしているが、暴露評価が適切に行われていない場合は、変異原性の有無が問題となることが多い。そのため、食品香料の安全性評価のためには適切な変異原性試験の実施が重要である。

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

これまで本研究班では、日本香料工業会の食品香料化合物データベース2015年版から電子データ化した3,943物質について、代表的な商業QSARモデルを用いてAmes試験結果の予測を行い、変異原性が疑われた物質について実試験を行うことで、QSAR予測の妥当性を検証すると同時に香料のAmes試験データの蓄積を図ってきた。同時に、2012年に小野らが報告した369香料から成るAmes試験データベースの内、未確定（Equivocal）とされた14物質の関連文献の再評価を行い、

専門家的考察により、14物質の再分類を行い、最終的に未確定のままであった4物質を除き、365物質から成るデータベースとして確立した。今年度は新たに追加実施した分も加え、国衛研変異遺伝部が実施した香料のAmes試験結果をまとめ、データを再評価して、小野らの香料Ames試験データベースの更新と堅牢化を図ることとした。

また本研究班では、上記に述べた香料の化学構造的な特徴に着目し、香料に特化したローカルQSARモデル（StarDrop QSARモデル）を開発し、当時の小野データベースのAmes試験結果に対して高い予測性を示したことを報告している。今回、国衛研変異遺伝部にて取得した香料のAmes試験結果を追加学習データとして取り入れ、StarDrop QSARモデルをバージョンアップすると同時に、更新した上記の香料Ames試験データベースに対する予測性能を代表的な商業QSARモデルと比較し、考察することとした。

## B. 研究方法

### B.1. Ames 試験

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

## B.2 香料 Ames 試験データベース

既に述べたように、2012年に小野らが報告 (Food and Chemical Toxicology 50, 1538-1546, 2012) した 369 香料から成る Ames 試験データベースの内、未確定 (Equivocal) とされた 14 物質の関連文献の再評価を行い、専門家的考察により、14 物質の再分類を行い、最終的に未確定のままであった 4 物質を除き、365 物質から成るデータベースとして確立している。

今年度は、これとは別に国衛研変異遺伝部が実試験を行った 45 香料の Ames 試験結果 (今年度実施分を含む) を取りまとめ、小野データベースに未収録の物質を追加、重複する物質は妥当性を吟味し、データを更新することで、データベースの拡充と堅牢化を図った。

## B.3 StarDrop QSAR モデル

英国オペティアム (日本代理店はヒューリンクス) が開発する QSAR の統合ソフトであり、構成するモジュールの一つである Auto-Modeller™を用いて、機械学習による独自の統計ベース QSAR モデルを開発することができる。

H30 年度に本研究班では、ヒューリンクス社との共同研究により、安衛法データベース (ANEI) や HANSEN などの外部公開データベースから抽出した香料あるいは香料類似物質の Ames 試験データを学習データとして、各種予測アルゴリズムと記述子を選択し、プロトタイプの開発と検証を繰り返した結果、小野らが報告している香料 Ames 試験データ (見直し後) 349 物質に対する感度は 84.6%、特異度は 97.5%、正確度は 96.6% と高い予測性能を示したことを報告した。

今回、国衛研変異遺伝部にて新たに実施した Ames 試験結果を学習データとして取り入れて StarDrop QSAR モデルをバージョンアップすると同時に、B.2. で示したように新たに構築した 406 香料の Ames 試験データベースに対する予測性能の評価を行い、代表的な商業 QSAR モデル、知識ベースの Lhasa Limited 社 (UK) の DEREK Nexus (ver. 6.1.0)、及び統計ベースの MultiCASE 社 (USA) の CASE Ultra (GT1\_BMUT モジュール、ver. 1.8.0.2) とそれぞれ比較した。

## C. 研究結果、および考察

### C.1. 香料 Ames 試験データベース構築

表 1 は国衛研変異遺伝部が実試験を行った 45 香料とその Ames 試験結果をまとめたものである。評価した 45 物質の内、15 物質が陽性、残り 30 物質が陰性結果であった。既存の小野データベースとの重複分は 7 物質あったが、内、2,3-pentanedione は小野データベースでは陰性との評価であったが、実試験により陽性と判定され、データを修正した。また allyl isothiocyanate は当初の小野データベースでは未確定 (Equivocal) とされていたもので、H30 年の報告書にて、関連文献の専門家的考察を行い、陽性と再分類した。しかし実試験では用量相関性かつ再現性のある反応が確認されたものの、明確な陽性基準に達しなかったため、試験報告書としては陰性との記載であった。今回、生データの再評価と関連文献及び代表的な QSAR モデルがいずれも陽性と判断していることを踏まえ、弱いながらも陽性と判定してデータベースを更新した (表 1)。当初の小野データベースにリストされている香料の Ames 試験結果は、生データが確認できない

文献情報によるものが多く、QSAR予測結果と一致しないデータについては優先的に現行基準での実試験を行い、データの堅牢性を高めていくことが重要と考える。更新した本データベースは論文化して対外公表した (Kasamatsu T et al. Genes and Environment. 2021, accepted)。次項に述べるように、本データベースは、QSARツールの予測性の評価のための標準物質データベース、及び新規QSARモデル開発のための学習データとしても利用可能である。なお、今年度新たに実施したAmes試験結果は表2としてまとめた。

## C.2. 香料に特化したStarDrop QSARモデルのバージョンアップ及び他の商業QSARモデルとの予測性能の比較

新たな学習データを基にバージョンアップしたStarDrop QSARモデル (NIHS 834\_67) について、更新した406香料のAmes試験データベースに対する予測性能の評価を行い、商業QSARモデル、DEREK Nexus (ver. 6.1.0) 及びCASE Ultra (GT1\_BMUTモジュール, ver. 1.8.0.2) と比較した結果を、表3及び表4に示す。StarDrop QSARモデル (NIHS 834\_67) の予測性能は感度79.5%、特異度96.4%、正確度94.6%と、Derek Nexus (感度70.5%、特異度96.1%、正確度93.3%) 及びCASE Ultra (感度70.5%、特異度90.3%、正確度88.2%) よりも優れていた。このことは香料の構造的な特徴に着目し、評価するケミカルスペースを絞り込んだアプローチが有効であったと考えられる。ただ比較した商業QSARモデルの予測性能についても、2012年に小野らが当初の367香料のAmes試験データベースに対して、それぞれの前身のQSARモデル

(Derek for Windows, MultiCASE) を用いて評価した際の予測性能は、Derek for Windowsが、感度38.9%、特異度93.3%、正確度88.0%、であり、MultiCASEが感度25.0%、特異度94.3%、正確度87.5%、であったことを考えると、QSARモデルの予測性能 (特に感度) はこの10年ほどの間に飛躍的に向上してきたといえる。実際のAmes試験におけるラボ間の再現性が85%程度であると報告されていることから今回示した予測性能は上限値にかなり近づいていると考えられるが、偽陰性及び偽陽性結果の解析により、現行モデルの更なる予測性能の向上を見込むことができる。

表5はStarDrop QSARモデル (NIHS 834\_67) が陽性を誤って陰性と判定した香料 (偽陰性物質) のリスト、表6は陰性を誤って陽性と判定した香料 (偽陽性物質) のリストを示す。偽陰性9物質の内、4つ (trans-cinnamaldehyde, 4-phenyl-3-buten-2-one, 4-methyl-2-pentenal、2-Furyl methyl ketone) は $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和カルボニル構造を有しており、比較した商業QSARモデルのどちらかは陽性予測結果を示していることから、「 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和カルボニル基」をアラート構造として学習データに取り込むことで、StarDrop QSARモデルの感度が更に向上する可能性がある。また偽陽性14物質の内、11は比較した商業QSARモデルの両方とも正しく陰性と評価していること、また7つがエステル類として区分される香料であり、これらの学習データへの取り込みによりStarDrop QSARモデルの特異性が向上する可能性がある。このような予測性能向上への取り組みを継続することによって、実試験

実施と遜色ない結果予測が可能になると考えられる。

#### D. 結論

香料のAmes試験データについて、国衛研変異遺伝部にて新たに実施した試験も含め、データの追加、再評価を行い、406物質からなる香料Ames試験データベースを完成させた。また香料に特化して開発したローカルQSARモデル (Star Drop) について、学習データの追加、工夫を行い、バージョンアップさせた。このQSARモデル (StarDrop NIHS 834\_67) の予測精度を、上記の香料Ames試験データベースに対して検証したところ、感度79.5%、特異度96.4%、精度94.6%と、他の商業QSARモデル (Derek Nexus及びCASE Ultra) よりも優れた性能を示した。このことは学習アプローチの工夫や対象ケミカルスペースの絞り込みが有効であったと考えられ、偽陽性や偽陰性の分析等を通じてさらなる改善を行うことにより、実試験に依らない評価を実現できる可能性が示された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Honma M, Kitazawa A, Kasamatsu T, Sugiyama KI. Screening for Ames mutagenicity of food flavor chemicals b

y (quantitative) structure-activity relationship. Genes and Environment 2020 42:32

- 2) Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama KI, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M. Development of a new quantitative structure-activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ Auto-Modeller™. Genes and Environment 2021 43:16

##### 2. 学会発表

- 1) 本間正充：生活環境で極低レベルで摂取する遺伝毒性発がん物質の安全性評価と管理、日本環境変異原学会第49回大会プログラム・要旨集(沼津)(2020.11)

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1 国衛研変異遺伝部にて実施した香料の Ames 試験結果 (まとめ)

No.	JECFA番号	香料	CAS No	純度(%)	供給元	Ames試験結果
1	128	hexyl acetate	142-92-7	99.7	Inoue Perfumery MFG.	陰性
2	236	delta-dodecalactone	713-95-1	98.5	SODA AROMATIC Co., Ltd.	陰性
3	255	2-methylbutyric acid	116-53-0	99.9	Inoue Perfumery MFG.	陰性
4	256	2-ethylbutanal	97-96-1	99.4	SODA AROMATIC Co., Ltd.	陰性
5	327	(5or6)-decanoic acid	72881-27-7	83.8	SODA AROMATIC Co., Ltd.	陰性
6	410	2,3-pentanedione	600-14-6	99.7	Frutarom Ltd	陽性**
7	452	dimethyl sulfide	75-18-3	25	Inoue Perfumery MFG.	陰性
8	470	2-[(methylthio)methyl]-2-butenal	40878-72-6	98.1	T. HASEGAWA CO., LTD.	陽性
9	520	2-mercaptopinane	23832-18-0	98.0	SIGMA ALDRICH	陰性
10	687	4'-methoxycinnamaldehyde	1963-36-6	98	Alfa Aesar	陽性
11	725	4-ethenyl-2-methoxyphenol	7786-61-0	99.8	T. HASEGAWA CO., LTD.	陰性
12	728	raspberry ketone	5471-51-2	99.9	Jiangxi Zhangshu Crown Capital Fragrance Limited	陽性
13	745	5-methylfurfural	620-02-0	99.8	R.C. Treatt & Co. Ltd	陰性
14	866	4-methylbenzaldehyde	104-87-0	99.6	Penta International	陰性
15	928	hexanal propyleneglycol acetal	1599-49-1	99.9	San-Ei Gen F.F.I.,Inc.	陰性
16	941	acetaldehyde diethyl acetal	105-57-7	99.4	Ogawa & Co., Ltd.	陰性
17	1031	2-(4-methyl-5-thiazolyl)ethanol	137-00-8	99.9	Inoue Perfumery MFG.	陰性
18	1072	2-furanmethanethiol	98-02-2	99.5	SIGMA ALDRICH	陰性
19	1208	4-methyl-2-pentenal	5362-56-1	99.2	T. HASEGAWA CO., LTD.	陽性
20	1256	isoeugenyl methyl ether	93-16-3	99.4	Inoue Perfumery MFG.	陰性
21	1301	indole	120-72-9	99.7	SIGMA ALDRICH	陰性
22	1304	skatole	83-34-1	98	SIGMA ALDRICH	陰性
23	1340	gamma-terpinene (p-Mentha-1,4-	99-85-4	98.7	Takata Koryo Co., Ltd.	陰性
24	1341	1,3,5-undecatriene	16356-11-9	96.6	Givaudan Japan K.K.	陰性
25	1354	2-hexenol	2305-21-7	96	SODA AROMATIC Co., Ltd.	陰性
26	1451	4-methoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-	4077-47-8	97	Tokyo Chemical Industry Co.,	陰性
27	1454	linalool oxide (furanoid)	1365-19-1	99.5	T. HASEGAWA CO., LTD.	陰性
28	1456	2,5-dimethyl-4-oxo-3(5H)-furyl acetate	4166-20-5	>95	Takata Koryo Co., Ltd.	陽性
29	1472	5-methyl-2-phenyl-2-hexenal	21834-92-4	96.5	Frutarom Ltd	陰性
30	1506	3-acetyl-2,5-dimethylfuran	10599-70-9	98	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	陽性
31	1519	4,5-dihydro-2,5-dimethyl-4-oxofuran-3-yl butyrate	114099-96-6	97.0	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	陽性
32	1560	allyl isothiocyanate	57-06-7	>97	Nippon Terpene Chemicals, Inc.	陽性
33	1853	2-(1-menthoxy)ethanol	38618-23-4	98.7	Takasago International	陰性
34	1882	vanillin propyleneglycol acetal	68527-74-2	98.8	Inoue Perfumery MFG.	陰性
35	1894	5-hexenyl isothiocyanate	49776-81-0	95.8	T. HASEGAWA CO., LTD.	陰性
36	2100	furfural propyleneglycol acetal	4359-54-0	99.7	Inoue Perfumery MFG. Co.,Ltd.	陽性
37	2101	furfuryl formate	13493-97-5	>98.9	T. HASEGAWA CO., LTD.	陽性
38	2141	butyl 2-naphthyl ether	10484-56-7	99.9	Koyo Chemical	陰性
39	2144	methyl beta-phenylglycidate	37161-74-3	99.8	T. HASEGAWA CO., LTD.	陽性
40	2157	6-methoxyquinoline	5263-87-6	98.9	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	陽性
41	-	2,4-dimethyl-4-	82461-14-1	99.2	Seikodo Ishida Co., Ltd.	陰性
42	-	2-butoxyethyl acetate	112-07-2	99.4	Tokyo Chemical Industry Co.,	陰性
43	-	2-methyl-2-butanethiol	1679-09-0	95	Tronto Research Chemicals	陰性
44	-	2-methylquinoline	91-63-4	98	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	陽性
45	-	S-methyl methanethiosulfonate	2949-92-0	98.3	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	陽性

表2 R2 年度試験化合物 QSAR 予測 Ames 試験結果







CAS#	物質名	構造	Derek Nexus	CASE ULTRA GT1_BMUT Probability (%)	Ames結果	結果詳細
14073-97-3	(-)-Menthone		INACTIVE	Known Positive 13.6	Negative	本試験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株、いずれの用量段階においても復発変異コロニー数を用意反応的に増加させず、それぞれの陰性対照と比較して2倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復発変異コロニー数は、全ての用量において、背景データから算出したそれぞれの陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果の再現性が確認された。 陰性対照群は、代謝活性化の有無に関わらず、全ての菌株に対して復発変異コロニー数をそれぞれの陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陰性対照の復発変異コロニー数の平均値は、用量設定試験及び本試験のいずれにおいても、背景データから算出した変動範囲の範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果から、試験が適切に実施されたと判断した。 以上の結果より、本試験条件下において本試験物質は遺伝子突然変異誘発性を有さないと判定した。
121-39-1	Ethyl 3-phenylglycidate		PLAUSIBLE	Known Positive 87.1	Positive	本試験物質は、代謝活性化の有無に関わらず <i>Salmonella typhimurium</i> TA100に対して、背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超える、用量反応的な復発変異コロニー数の増加を示した。また、代謝活性化非存在下では、用量設定試験及び確認試験において陰性対照の2倍を超える増加が認められ、試験結果に再現性が確認された。最大比活性値は、確認試験の5000 µg/plateにおいて36.2を示した。その他の菌株では、代謝活性化の有無に関わらず復発変異コロニー数の用量反応的な増加、及び陰性対照の2倍以上の増加は認められず、被験物質処理の用量あたりの復発変異コロニー数は、すべて背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。 陰性対照群は、代謝活性化の有無に関わらず、全ての菌株に対して復発変異コロニー数をそれぞれの陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陰性対照の復発変異コロニー数の平均値は、用量設定試験及び本試験のいずれにおいても、背景データから算出した変動範囲の範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果から、試験が適切に実施されたと判断した。
99-87-6	p-Cymene		INACTIVE	Negative 21.4	Negative	本試験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株、いずれの用量段階においても復発変異コロニー数を用意反応的に増加させず、それぞれの陰性対照と比較して2倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復発変異コロニー数は、全ての用量において、背景データから算出したそれぞれの陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果の再現性が確認された。 陰性対照群は、代謝活性化の有無に関わらず、全ての菌株に対して復発変異コロニー数をそれぞれの陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陰性対照の復発変異コロニー数の平均値は、用量設定試験及び本試験のいずれにおいても、背景データから算出した変動範囲の範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果から、試験が適切に実施されたと判断した。
27538-09-6	5-ethyl-4-hydroxy-2-methylfuran-3(2H)-one		PLAUSIBLE	Negative 35.5	Positive	本試験物質は、代謝活性化の有無に関わらず <i>Salmonella typhimurium</i> TA100に対して、背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超える、用量反応的な復発変異コロニー数の増加を示した。また、代謝活性化非存在下では、陰性対照の2倍を超える増加が認められ、試験結果に再現性が確認された。最大比活性値は、本試験の5000 µg/plateにおいて34.6を示した。また、代謝活性化非存在下の <i>Salmonella typhimurium</i> TA98では、用量設定試験において最高用量の5000 µg/plateで変動範囲の上限(34)を超える復発変異コロニー数の増加が認められた。この増加は、本試験においても変動範囲の上限を超えなかったが、上限に近い増加を示した。しかし、これが本試験物質の復発変異誘発性の誘因に基づく増加であるかは、明確ではなかった。その他の菌株では、代謝活性化の有無に関わらず復発変異コロニー数の用量反応的な増加、及び陰性対照の2倍以上の増加は認められず、被験物質処理の用量あたりの復発変異コロニー数は、すべて背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。 陰性対照群は、代謝活性化の有無に関わらず、全ての菌株に対して復発変異コロニー数をそれぞれの陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陰性対照の復発変異コロニー数の平均値は、用量設定試験及び本試験のいずれにおいても、背景データから算出した変動範囲の範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果から、試験が適切に実施されたと判断した。 以上の結果より、本試験物質は遺伝子突然変異誘発性を有すると判定した。
4466-24-4	2-butylfuran		EQUIVOCAL	Inconclusive 55.1	Negative	本試験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株、いずれの用量段階においても復発変異コロニー数を用意反応的に増加させず、それぞれの陰性対照と比較して2倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復発変異コロニー数は、全ての用量において、背景データから算出したそれぞれの陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。また、用量設定試験及び本試験において試験結果の再現性が確認された。 陰性対照群は、代謝活性化の有無に関わらず、全ての菌株に対して復発変異コロニー数をそれぞれの陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陰性対照の復発変異コロニー数の平均値は、用量設定試験及び本試験のいずれにおいても、背景データから算出した変動範囲の範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果から、試験が適切に実施されたと判断した。 以上の結果より、本試験条件下において本試験物質は遺伝子突然変異誘発性を有さないと判定した。
4208-57-5	2-butylfuran		EQUIVOCAL	Inconclusive 50.9	Negative	本試験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株、いずれの用量段階においても復発変異コロニー数を用意反応的に増加させず、それぞれの陰性対照と比較して2倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復発変異コロニー数は、全ての用量において、背景データから算出したそれぞれの陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果の再現性が確認された。 陰性対照群は、代謝活性化の有無に関わらず、全ての菌株に対して復発変異コロニー数をそれぞれの陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陰性対照の復発変異コロニー数の平均値は、用量設定試験及び本試験のいずれにおいても、背景データから算出した変動範囲の範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果から、試験が適切に実施されたと判断した。 以上の結果より、本試験条件下において本試験物質は遺伝子突然変異誘発性を有さないと判定した。



表 3 QSARモデル予測結果

QSARモデル		StarDrop NIHS 834_67		Derek Nexus 6.1.0		CASE Ultra 1.8.0.2 GT1_BMUT		
		P	N	P	N	P	N	OOD
Ames試験 結果	P	35	9	31	13	31	12	1
	N	13	349	14	348	28	327	7

P: 陽性、N: 陰性、OOD: 適用外

表 4 QSAR モデル予測性能の指標による比較

QSAR モデル	感度 (%)	特異度 (%)	正確度 (%)	適用度 (%)
StarDrop NIHS 834_67	79.5	96.4	94.6	100.0
Derek Nexus 6.1.0	70.5	96.1	93.3	100.0
CASE Ultra 1.8.0.2 GT1_BMUT	70.5	90.3	88.2	98.0

表5 StarDrop QSAR モデルの偽陰性予測物質







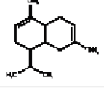

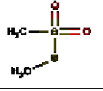
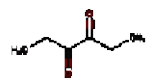


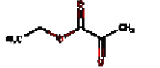

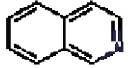
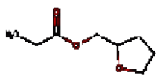
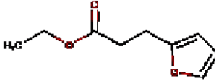
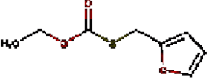


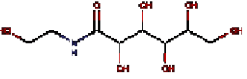
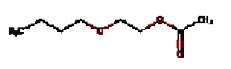
No.	香料	CAS No.	構造	構造分類	備考
1	Menthone	89-80-5		ケトン類	DEREK: INACTIVE CASE Ultra: Known Negative
2	trans-cinnamaldehyde	104-55-2		芳香族アルデヒド類	DEREK: PLAUSIBLE CASE Ultra: Known Positive
3	raspberry ketone	5471-51-2		ケトン類	DEREK: INACTIVE CASE Ultra: Negative
4	2,6-dimethylpyrazine	108-50-9		新規指定香料化合物	DEREK: INACTIVE CASE Ultra: Known Positive
5	4-phenyl-3-buten-2-one	122-57-6		ケトン類	DEREK: INACTIVE CASE Ultra: Known Positive
6	4-methyl-2-pentenal	5362-56-1		脂肪族高級アルコール類	DEREK: PLAUSIBLE CASE Ultra: Positive
7	cadinene (mixture of isomers)	29350-73-0		テルペン系炭化水素類	DEREK: INACTIVE CASE Ultra: Known Negative
8	2-Furyl methyl ketone	1192-62-7		ケトン類	DEREK: EQUIVOCAL CASE Ultra: Known Positive
9	S-methyl methanethiosulfonate	2949-92-0		エステル類	DEREK: INACTIVE CASE Ultra: Out of Domain

表6 StarDrop QSAR モデルの偽陽性予測物質

No.	香料	CAS No.	構造	構造分類	備考
1	3,4-hexanedione	4437-51-8		ケトン類	DEREK: <b>PLAUSIBLE</b> CASE Ultra: <b>Known Positive</b>
2	ethyl acetoacetate	141-97-9		エステル類	DEREK: <b>INACTIVE</b> CASE Ultra: <b>Known Negative</b>
3	phenyl salicylate	118-55-8		エステル類	DEREK: <b>INACTIVE</b> CASE Ultra: <b>Known Negative</b>
4	ethyl pyruvate	617-35-6		エステル類	DEREK: <b>INACTIVE</b> CASE Ultra: <b>Known Negative</b>
5	3-penten-2-one	625-33-2		ケトン類	DEREK: <b>INACTIVE</b> CASE Ultra: <b>Negative</b>
6	isoquinoline	119-65-3		新規指定香料化合物	DEREK: <b>INACTIVE</b> CASE Ultra: <b>Known Negative</b>
7	tetrahydrofurfuryl propionate	637-65-0		エステル類	DEREK: <b>INACTIVE</b> CASE Ultra: <b>Negative</b>
8	ethyl 3-(2-furyl)propanoate	10031-90-0		エステル類	DEREK: <b>INACTIVE</b> CASE Ultra: <b>Negative</b>
9	O-ethyl S-(2-furylmethyl)thiocarbonate	376595-42-5		エステル類	DEREK: <b>INACTIVE</b> CASE Ultra: <b>Negative</b>
10	acetamide	60-35-5		日本では香料に該当しない化合物	DEREK: <b>INACTIVE</b> CASE Ultra: <b>Known Negative</b>
11	dihydroxyacetone dimer	62147-49-3		ケトン類	DEREK: <b>INACTIVE</b> CASE Ultra: <b>Known Positive</b>
12	N-gluconyl ethanolamine	686298-93-1		日本では香料に該当しない化合物	DEREK: <b>INACTIVE</b> CASE Ultra: <b>Negative</b>
13	2-butoxyethyl acetate	112-07-2		エステル類	DEREK: <b>INACTIVE</b> CASE Ultra: <b>Negative</b>

令和2年度 厚生労働科学研究費（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

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

分担研究課題名：Ames試験陽性のフォローアップのためのヒトTK6細胞を用いたTK遺伝子突然変異  
アッセイを使用した証拠の重みアプローチ

分担研究者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

### 研究要旨

細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）と哺乳類の発がん性試験の間で矛盾する結果は、代謝、ゲノム構造、および DNA 修復システムによる種の違いが原因である可能性がある。ヒト細胞を用いた突然変異試験は、Ames 試験で陽性判定となった時のフォローアップ試験として有利であると考えられている。本研究では、突然変異試験で相反する結果（Ames 試験で陽性、げっ歯類発がん性試験で陰性）を持つ 10 種類の化学物質をヒトリンパ芽球 TK6 細胞によるチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験（OECD ガイドライン TG490）で調べた。その結果、10 物質中 2 物質が総合判定で陰性であった（フォローアップ試験として 20%有効）。これらの 8 つの陽性物質のうち 3 つは、S9 無しの同一の非代謝活性化条件にもかかわらず、短時間処理後に陰性、24 時間処理後に陽性であった。その 3 つのうちの 1 物質である 4-ニトロアントラニル酸で処理された TK6 細胞のトキシコプロテオミクスを行い、その試験結果の解釈を考察した。24 時間処理後に発現差のあるタンパク質を使用した分析は、*in vitro* 特異的酸化ストレスが TK6 アッセイにおける偽陽性応答に関与していることが分かった。プロテオミクスなどの新しい技術と組み合わせられていない方法による TK6 アッセイの有用性は、フォローアップ試験として限定的であるとわかったが、それでも Ames 試験での偽陽性結果を減少（20%）させる可能性があった。したがって、トキシコプロテオミクスと組み合わせる TK6 アッセイは、24 時間の特異的反応によって引き起こされた偽陽性の結果を解釈するのに役立つ可能性があり、Ames 試験の偽陽性の減少（20%以上）をもたらすと考えられた。

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

### A. 研究目的

Ames 試験陽性の結果は、医薬品等の開発に大きな影響を与え、適切なフォローアップが必要となるが、*in vivo* トランスジェニック試験は負担が大きいと考えられる。少なくともその陽性反応がバクテリア特異的反応である場合、ヒトへの外挿性が低いことを証明し、無駄な *in*

*vivo* 試験を避けることができる可能性がある。

一方、Ames 試験と発がん性の特異性（Specificity; Ames 試験陰性で発がん性陰性）は 80%程度で有り（Kirkland *et al.*, *Mutat Res* 584, 1-256 (2005)), これは Ames 試験陽性で発がん性陰性であるものは比較的少ないことを示している。それでも、バクテリア特異的な陽性反

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

実際に、Ames試験陽性で発がん性陰性の物質にはニトロ芳香族や芳香族アミン類が多いことが知られている。しかしながら、ニトロ芳香族、芳香族アミン類の中には発がん性を示すものも多く存在している。このように、同じAmes試験陽性でありながら、何故発がん性の有無に違いがあるのかは不明である。つまり、Ames試験陽性の非発がん性物質を、ほ乳類細胞を用いた遺伝毒性試験(チミジンキナーゼ遺伝子変異試験(TK6アッセイ))でフォローアップし、ほ乳類細胞でも同様に変異原性を示すかどうかを検証すべきと考えられる。

作用機序を考慮することは、化学物質の安全性評価のための非動物試験系を確立するうえで重要である。経済協力開発機構(OECD)は、AOPに基づく*in silico*および*in vitro*情報を組み合わせたAOPおよびIATAを精力的に開発してきた(Guidance Document for the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). OECD Guidel Test Chem. (2016))。AOPとIATAは、遺伝毒性および規制上の結論の導出を含む証拠の重み(WoE)を基礎とする正確な毒物学的評価に貢献している。化粧品原料の安全性評価のために*in vivo*試験が禁止されているため、化粧品業界では*in vitro*試験に基づくWoEアプローチの使用が比較的進んでいる(SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 10th revision. Scs. (2018))。さらに、トランスクリプトームやプロテオームなどのオミクス技術は、WoEアプローチの実装において重要な役割を果たす。Atesら

の研究チーム (*Mutagenesis*. 31:453-61 (2016))は、*in vitro*トランスクリプトミクスアプローチを使用して、*in silico*分析では陰性であったがAmes試験では陽性であった化粧品成分の遺伝子毒性予測を評価した。トランスクリプトミクスデータは、遺伝子発現および代謝経路レベルでの毒性評価に必要な機構情報を提供することが報告された。さらに、Kirklandら (*Mutat Res*. 775-776:55-68 (2014)、*Mutat Res*. 775-776:69-80 (2014))は、遺伝子発現プロファイリングなどのフォローアップ*in vitro*試験が、*in vivo*遺伝毒性または発がん性に対する*in vitro*遺伝毒性結果のヒトへの関連性の解釈に大いに役立つ可能性があることを報告した。したがって、WoEアプローチは、陽性のAmes試験のフォローアップ戦略にも役立ち、動物実験への依存を減らしながら、ヒトリスクの新しい評価戦略に着実に移行すると考えられる。

ヒトTK6細胞は、Ames試験で陽性の結果を精査するためのWoEアプローチに役立つ可能性がある。しかし、この目的のためのTK6アッセイの有用性についてはほとんど知られていない。したがって、本研究では、日本の10研究所との共同研究で、Ames試験陽性である10個の非発がん性化学物質を用いて、TK6アッセイを実施した。アッセイは、短時間処理(ラット肝臓S9の存在下および非存在下で4時間)および連続処理(S9の非存在下で24時間)の処理方法で実施された。さらに、トキシコプロテオミクス分析とTK6アッセイの統合を検討し、試験結果の解釈とWoEの有用性の向上を見出した。

## B. 研究方法

### 1. 共同研究組織の構築

Ames試験陽性の非発がん性物質(10物質; Table 1参照)が多数におよぶため、日本環境変異原学会の分科会であるMMS研究会で共同研究を提案した。共同研究組織を立ち上げ、TK6

アッセイを分担するために各施設で担当する物質を決定した。

2. TK6 アッセイプロトコールの評価と共有化  
共同研究で使用する TK6 アッセイの実験プロトコールは、OECD ガイドライン TG-490 (チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験) に基づくが、より実験施設間のデータばらつきを最小にするために、実験条件や操作方法をさらに確認・評価し、共同研究組織内で現実的に利用できる実験プロトコールを共有化した。

### 3. 細胞と培養

TK6 細胞を購入する際は、JCRB 細胞バンク、あるいは the American Type Culture Collection より購入する。細胞は、10% 馬血清 (JRH Bioscience; ロット#16J196)、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ピルビン酸ナトリウム、100 U/mL ペニシリン、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ストレプトマイシン (メーカー問わず) を含む RPMI 培地 (ナカライテスク、あるいはサーモフィッシャー製) で培養した (37 度、5%  $\text{CO}_2$ )。

### 4. 被験物質の処理方法

被験物質の処理は、Table 2 に示した方法を参考に実施した。細胞液の濃度や容量は適宜変更して構わないが、処理する細胞数は  $2 \times 10^7$  cells とした。被験物質を DMSO、あるいはエタノール (メーカー問わず) で溶解後、S9mix (オリエンタル酵母工業(株)) の存在下、あるいは非存在下 (150 mM KCl) において、対数増殖期にある TK6 細胞に暴露し、短時間処理では 4 時間、長時間処理では 24 時間培養した。処理中の振とう・非振とうは、結果への影響が少ないため共同研究施設の自由とした。

用量設定試験は、陰性対照と被験物質は 1 系列で行い、陽性対照は実施しない。本試験は、陰性対照は 2 系列、被験物質は 1 系列で行った。陽性対照物質は、Table 3 に示したように、代謝

活性化条件ではシクロホスファミド (CP)、非代謝活性化条件ではメタンスルホン酸メチル (MMS) の製品と製造ロットを使用した。

被験物質の処理後、遠心分離し、上清を除去後、無血清培地で細胞を洗浄した。遠心分離の条件は、約 1000 rpm、5 分間で実施した。再度、その細胞懸濁液を遠心分離し、上清を除去後、10% 血清を含む培地 50 ml で細胞を分散させ細胞濃度を測定した。その 50 ml (濃度約  $4 \times 10^5$  cells/ml) の処理細胞は、37 度、5%  $\text{CO}_2$  で培養を開始し、TK6 アッセイに用いた。それとは別に、平板効率 Cloning Efficiency (CE) を計算するため (式 1)、約 1.6 cell/ウェルの濃度で 96 ウェルマイクロプレートで 2 週間培養した。

### 5. 細胞相対生存率の測定

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

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

また、暴露処理中の細胞毒性が強い場合など、細胞数消失があるため、次の計算式 (式 2) で CE を補正した。“処理終了時の細胞数” は、前述の「4. 被験物質の処理方法」において処理終了時の遠心分離後に得られた細胞数である。

“処理開始時の細胞数” は、 $2 \times 10^7$  cells (Table 2) である。

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

細胞生存率を調べるために、処理直後に細胞を播く CE0 播種、および処理してから 3 日後に細胞を播く CE3 播種を実施した。被験物質で処理された直後の細胞相対生存率 RS0 (%) は、CE0 から算出され、次の式 3 で計算した。陰性

対照 (DMSO およびエタノール) の生存率を 100 % と定義した。なお、細胞毒性がある場合、RS0 = 20~10% の用量を最高用量として設定した。

もし、RS0 = 20~10% で細胞毒性が強い、あるいは再現性が低い等で試験続行が困難な場合は、後述する RTG = 20~10% となる用量を最高用量として TK6 アッセイを実施してもよいこととした。

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

#### 6. TK6 アッセイの本試験、および細胞毒性指標 (RSG と RTG) の測定

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

N-MF ;  $EW_N = 192 - A$

$TW_N = 192$

S-MF ;  $EW_S = (192 - A) - B$

$TW_S = 192 - A$

T-MF ;  $EW_T = 192 - (A + B)$

$TW_T = 192$

(192 個のウェルのうち 14 日後の観察で NG コロニーを含むウェルが A 個、28 日後の観察時に SG コロニーのみを含むウェルが B 個出現したとする)

統計解析方法に関して、TK6 アッセイの本試験は、陰性対照を 2 系列、被験物質を 1 系列で行い、修飾されたダネット検定、ダウンターンデータを検出するシンプソン・マーゴリン検定、および、トレンド検定による大森法 (Omori *et al.*, *Mutat Res* 517, 199-208 (2002); Simpson *et al.*, *Biometrika*. 73, 589-96 (1986)) を用いて統計解析を実施した。

## 7. プロテオミクス分析

各凍結細胞ペレットを PTS (相間移動界面活性剤) バッファーと混合し、95° C で 5 分間煮沸した (Masuda *et al.*, *J Proteome Res*. 7, 731-40 (2008))。細胞ライセートを Bioruptor ソニケーター (Cosmo Bio) でさらに 3 回超音波処理した (1 サイクルあたり 15 分)。次に、サンプルを 10 mM TCEP (トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン) で還元し、20 mM ヨードアセトアミドでアルキル化し、続いてトリプシン (タンパク質重量 : 1/50) および Lys-C (タンパク質重量 : 1/50) で 37° C で 16 時間反応した。ペプチドは、20,000 g で 10 分間遠心分離し、C18-SCX StageTips で脱塩した (Adachi *et al.*, *Anal Chem*. 88, 7899-903 (2016))。

LC-MS / MS は、UltiMate 3000 Nano LC システム (Thermo Scientific) と HTC-PAL オートサンプラー (CTC Analytics) を Q Exactive ハイブ

リッド四重極-Orbitrap 質量分析計 (Thermo Scientific) に接続することによって実施した。ペプチドを分析カラム (75  $\mu$  m  $\times$  30 cm, ReproSil-Pur C18-AQ, 樹脂 1.9  $\mu$  m) にロードし、280 nL / min の流速で分離した。溶媒 B の 5% から 35% までの 45 分の勾配 (溶媒 A, 0.1% FA および 2% アセトニトリル、溶媒 B, 0.1% FA および 90% アセトニトリル)。Q Exactive は、DDA モードで操作した。サーベイフルスキャン MS スペクトル (350~1800 m/z) は、イオンが  $3 \times 10^6$  のターゲット値に蓄積された後、70,000 の分解能で Orbitrap によって取得した。Dynamic exclusion は 10 秒に設定した。最も強力な 12 個の乗算された荷電イオン ( $z \geq 2$ ) は、 $1 \times 10^5$  のターゲット値まで順次蓄積され、最大注入時間 120 ms、分解能 35,000 の高エネルギー衝突解離 (HCD) によってコリジョンセル内でフラグメント化した。典型的な質量分析条件は、スプレー電圧は 2 kV、加熱されたキャピラリー温度は 250° C、正規化された HCD 衝突エネルギーは 25% で実施した。MS / MS イオン選択 threshold は  $2.5 \times 10^4$  カウントに設定された。2.0 Da の分離幅が選択した。

Raw MS データは、ピークの検出と定量化のために MaxQuant (バージョン 1.6.3.3) によって処理した。MS/MS スペクトルは、検索パラメーターとして、完全なトリプシン特異性は、最大 2 つの切断部位の欠落、固定修飾としてシステイン残基のカルバミドメチル化を設定した、また、可変修飾として N 末端タンパク質アセチル化とメチオニン酸化を設定した。UniProt ヒトデータベースに対して検索した。検索結果は、タンパク質および PSM レベルで 0.01 の最大 FDR (誤検出率) にフィルタリングした。

## 8. 発現変動解析

Log 2 LFQ 強度のすべての NaN 値は -7 に変換した (本研究で観察された LFQ 強度の最小値とほぼ同等の値)。次に、LFQ 強度 (log2 LFQ 強度の真数) をサンプル処理グループに、それぞれ



れ未処理（コントロール）グループ（4時間および24時間処理グループ）の強度で割ることにより、倍率変化値を計算した。次に、 $\log_2$ 倍の変化を計算した。最後に、各サンプル処理グループで顕著に発現変動したタンパク質（DEP）が、 $\log_2$ 倍以上の変化したものを同定した。次に、最高用量での連続処理における特異的影響を分析するために、24時間800  $\mu\text{g/mL}$  グループのDEPを、24時間800  $\mu\text{g/mL}$  グループと他のグループが1以上の間の $\log_2$ 倍変化したものについてさらにスクリーニングした。これにより、24時間800  $\mu\text{g/mL}$  グループの特異的DEPを特定した。LFQ強度の $\log_2$ 倍の変化を使用して、Rパッケージ（heatmap3）を使用するヒートマップを生成した。エンリッチメント解析は、DEPの生物学的プロセスと分子機能を解釈するために使用した。DAVID bioinformatics v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) は、DEPに相関するGO（Gene Ontology）用語と経路に注釈を付けるために使用された。

## 9. 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 欠損細胞を用いるTK6アッセイ

4-ニトロアントラニル酸の24時間処理における酸化ストレスの遺伝毒性を調べるために、すでに構築済みのOGG1（8-oxoguanine DNA glycosylase 1）欠損TK6細胞を用いてTK6アッセイを実施した。過酸化水素などの陽性対照物質を4時間処理してもOGG1欠損細胞のフェノタイプを確認できなかったため、本研究では、前述と同様の方法で、過酸化水素と4-ニトロアントラニル酸の24時間処理を実施した。

## C. 結果と考察

### 1. 陰性対照および陽性対照コントロールデータ

陰性対照コントロールのMFは、S9mix非存在下の短時間処理では $2.5\sim 16.9 \times 10^{-6}$ （平均 $6.36 \times 10^{-6}$ ）、S9mix存在下の短時間処理では $1.7\sim 16.8 \times 10^{-6}$ （平均 $6.78 \times 10^{-6}$ ）であった。S9mi

x非存在下の24時間処理の場合は $2.3\sim 15.5 \times 10^{-6}$ （平均 $9.09 \times 10^{-6}$ ）だった。国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部のヒストリカルデータにおいて、自発的変異頻度は $4\sim 10 \times 10^{-6}$ であり、これらの平均値はOECD TG490による基準をほぼ満たしていると考えられた。

さらに、同時陽性対照のMFは、S9mix非存在下の短時間処理のMMSで $9.4\sim 71.7 \times 10^{-6}$ （平均 $30.1 \times 10^{-6}$ ）、S9mix存在下の短時間処理のCPで $10.4\sim 57.8 \times 10^{-6}$ （平均 $28.6 \times 10^{-6}$ ）だった。S9mix非存在下の24時間処理中のMMSでは、 $18.2\sim 120 \times 10^{-6}$ （平均 $61.6 \times 10^{-6}$ ）だった。したがって、同時陽性対照は、同時陰性対照と比較して統計的に有意な増加を示した。

### 2. Ames試験陽性の物質をフォローアップするためのTK6アッセイの有用性

Figure 1 および Table 4 に示したとおり、10物質中2物質が総合判定で陰性であった（フォローアップ試験として20%有効）。この共同研究で使用された10試験物質は、ほとんどがアミノ基またはニトロ基を含む多環式芳香族化合物だった。化学構造の特性（被験物質の官能基の有無、Ames試験陽性となる濃度や比活性値など）を調べて、規則性またはTK6アッセイの結果との相関関係を調べた。残念ながら、それらの特性と本研究で得られた変異原性の結果との間に規則性は見つけることができなかった。

TK6アッセイでは、2,5-ジアミノトルエンとヨードホルムの2つの物質が陰性であり（フォローアップ試験として20%有効）、残りの8つの物質が陽性であった（Figure 1、および Table 4）。これらの物質のうち7つはL5178Y細胞を使用したマウスリンフォーマ試験（MLA）によって報告され、消費者安全科学委員会（SCCS）およびNational Toxicology Program（NTP）データベースによって陰性および陽性と報告された2,5-ジアミノトルエンの「inconclusive」判断

を含む7つすべてが陽性の結果を示した (Table 4)。p53 を有する TK6 細胞と比較して、p53 欠損の L5178Y 細胞は、紡錘体チェックポイントの破壊とアポトーシスのために紡錘体阻害剤に対してより感受性が高いと考えられる

(Honma M et al., *Environ Mol Mutagen.* 52, 373-84(2011))。さらに、Whitwell らは、ヒト TK6 細胞の使用は、*in vitro* アッセイでの偽陽性結果を減らすのに役立つ、げっ歯類の L5178Y 細胞よりも好ましいと報告している (Whitwell et al., *Mutat Res* 789-790, 7-27 (2015))。この研究では 2,5-ジアミノトルエンが陰性であるため、TK6 アッセイは、Ames 試験の偽陽性結果のフォローアップに役立つ可能性を示していると考えられる。

### 3. トキシコプロテオミクス

本研究の8つの陽性物質のうち3つ (2,6-ジアミノトルエン、HC ブルーNo. 2、および4-ニトロアントラニル酸) は、興味深いことに、短時間処理後に陰性、24時間処理後に陽性だった (Table 4)。両処理法ともに、S9 の非存在下での同一の処理条件であるにも関わらず、結果が異なった。つまり、わずか20時間の延長された処理時間で、これらの物質の判定は陰性から陽性に変化した (Table 4)。その原因を明らかにするために、4-ニトロアントラニル酸 (0, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用いてトキシコプロテオミクスを実施した。その結果、合計1078のDEP (4時間400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  群: 359タンパク質、4時間800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  群: 506タンパク質、24時間400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  群: 358タンパク質、24時間800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  群: 420タンパク質) は、 $\log_2$  の2倍以上の変化に基づいて同定され。さらに、24時間800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  群と他の群  $\geq 1$  の間の  $\log_2$  倍以上の変化に基づいて、24時間800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  群の420 DEP から168個の特異的 DEP が抽出された。

Figure 2 に示したとおり、群間の特定の GO 用語のターゲット分析では、GO:0006974 (DNA 損傷刺激に対する細胞応答)、GO:0006979 (酸

化ストレスに対する応答)、および GO:0006281 (DNA 修復) の P 値は 0.05 未満であり、有意差がなかった。一方、GO:0008631 酸化ストレスに応答したアポトーシスシグナル伝達経路のスコアは、24時間800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  群の DEP および24時間800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  群の特異的 DEP で劇的に増加した。つまり、その結果は、24時間処理のみで4-ニトロアントラニル酸による酸化ストレスの関与を示していた。

24時間800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  群の DEP では、酸化ストレスに応答した GO:0008631 (アポトーシスシグナル伝達経路) 中の3つのタンパク質 ([ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (アセチル転移)] キナーゼイソザイム1、ミトコンドリアホスホイノシチド依存性キナーゼ1: PDK1、スーパーオキシドジスムターゼ2 (ミトコンドリア): SOD2、低PIにおける直接IAP結合タンパク質: DIABLO) が含まれていた (Figure 3)。これらのタンパク質の発現レベルは、24時間処理後にのみ上昇した。さらに、SOD2 の発現レベルは用量依存的に上昇し、PDK1 と DIABLO は800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  でのみ上昇した (Figure 3)。これらのタンパク質は、すべて酸化ストレスへの応答に関与した。主要な抗酸化酵素 (カタラーゼおよび GSR) の用量および時間依存性の増加傾向についても、プロテオミクス分析で確認された。おそらく、短時間処理後、TK6 細胞のグルタチオンや関連酵素などの抗酸化防御は ROS 損傷を抑制することができたが、長時間処理では、抗酸化酵素の枯渇による酸化ストレスの増加が予想された。

酸化ストレスは、*in vitro* での特異的な遺伝毒性の一般的なメカニズムと考えられている。一般的に、*in vivo* での哺乳動物組織は、培養中の細胞よりも優れた抗酸化防御を示す可能性が高い。このような場合、ROS の生成を介して遺伝毒性を誘発する化学物質は、DNA に直接損傷を与えるが、閾値があると予想される (Kirkland et al., *Mutagenesis* 22:161-75 (2007))。本研究で見出された酸化ストレスに関与する DEP は、同様

に矛盾する試験結果を持つ他の化学物質で、DEP が観察されるかどうかを確認するために、さらなる研究解析が必要である。同じ特徴が観察された場合、これらのタンパク質（または遺伝子）または ROS の定量化は、作用機序 (MOA) の観点から *in vitro* での特異的陽性結果を識別するための有望な解決策を提供できる。

また、予備実験として、4-ニトロアントラニル酸の 24 時間処理における酸化ストレスの遺伝毒性を調べるために、すでに構築済みの OGG1 欠損細胞を用いて TK6 アッセイを実施した (Figure 4)。コントロール実験として、過酸化水素を 24 時間処理した時、OGG1 欠損細胞および TK6 細胞ともに最適用量 (RS=10~20%) が 70~80  $\mu\text{M}$  付近であり、有意差が無いと考えられた (一度の実験のため、再実験が必要となる)。本試験を 80  $\mu\text{M}$  最高用量で実施した結果、OGG1 欠損細胞の MF は、TK6 細胞のそれよりも明らかに上昇し、有意差があると考えられた (一度の実験のため、再実験が必要となる)。データを示さないが過酸化水素 4 時間処理では、OGG1 欠損と TK6 細胞の間には有意な差が無かった。

一方、4-ニトロアントラニル酸を 24 時間処理した結果、OGG1 欠損と TK6 細胞の MF は、未処理群のそれよりも 2 倍以上に上昇し、どちらも陽性判定であるが、OGG1 欠損と TK6 細胞の間には有意な差が無かった (Figure 4)。前述のトキシコプロテオミクスでは、800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 4-ニトロアントラニル酸を使用し、DEP 分析で酸化ストレス応答を確認したが、それよりも高い濃度 (1138.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で TK6 アッセイを実施したため、OGG1 欠損細胞は MF を有意に上昇させると予想していたが、そうではなかった。その原因として、OGG1 タンパク質の主な役割は、DNA 付加体 8-オキシグアニンを DNA から除去修復することであり、4-ニトロアントラニル酸は、8-オキシグアニンだけでなく、他の DNA 付加体も形成させたかもしれない (8-オキシグアニンは、OGG1 欠損した細胞であっても、ミ

スマッチ修復経路などのバックアップ機構で修復される)。また、プロテオミクス手法は、TK6 アッセイの MF が変動しなくても、酸化ストレス応答など高感度に細胞内生体防御機構を検出できるのかもしれない。

## D. 結 論

プロテオミクスなど新しい技術と組み合わせない方法の TK6 アッセイの有用性は、フォローアップ試験として限定的であるとわかったが、それでも Ames 試験での偽陽性結果を減らす (20%) のに役立つ可能性があった。

さらに、*in vitro* 特異的遺伝毒性は長時間処理で顕著に示されたが、偽陽性化合物のプロテオミクスにより、長時間処理中の酸化ストレスによって引き起こされる遺伝毒性の作用機序が明らかになった。

したがって、オミクス技術と TK6 アッセイの統合は、24 時間処理特異的な陽性における不規則な結果の解釈に寄与する可能性があり、Ames 試験のフォローアップで偽陽性をさらに減少 (20%以上) させることにつながると考えられた。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) [Yasui M](#), Fukuda T, Ukai A, Maniwa J, Imamura T, Hashizume T, Yamamoto H, Shibuya K, Narumi K, Fujiishi Y, Okada E, Fujishima S, Yamamoto M, Otani N, Nakamura M, Nishimura R, Ueda M, Mishima M, Matsuzaki K, Takeiri A, Tanaka K, Okada Y, Nakagawa M, Hamada S, Kajikawa A, Honda H, Adachi J, Masaki K, Ogawa K, [Honma M](#). ; Weight of evidence approach using a TK gene mutation assay with human TK6 cells for follow-up of positive results in Ames tests: a

collaborative study by MMS/JEMS. Genes Environ. 43(1):7 (2021). doi: 10.1186/s41021-021-00179-1. PMID: 33676587.

## 2. 学会発表

- 1) 安井 学, 鵜飼明子, 本田大士, 山田雅巳, 鈴木孝昌; ヒト肝及びラット肝 S9 の比較プロテオーム解析. 日本環境変異原学会第 49 回大会(2020.11.27).
- 2) 福田隆之, 鵜飼明子, 西村諒一, 中村真生, 佐々 彰, 安井 学; TK6 細胞を用いた *in vitro* 小核試験結果における MGMT 遺伝子発現の役割. 日本環境変異原学会第 49 回大会(2020.11.27).

## G. 知的所有権の取得状況

なし

**Table 1. Participantes and test substances in the collaborative study**

No.	Participating Laboratories	Investigators	Test Substances	CAS No.	Manufacturer, Lot#	Solvent
1	Ina Research Inc.	Tadashi Imamura	4-(Chloroacetyl)acetaniilide	140-49-8	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Lot#KPJ1678	DMSO
2	Japan Tobacco Inc.	Tsuneo Hashizume, Haruna Yamamoto, Kaori Shibuya	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	6959-47-3	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#7BOQI-IC	DMSO
3	Yakult Central Institute	Kazunori Narumi, Yohei Fujiishi, Emiko Okada	2,6-Diaminotoluene	823-40-5	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#UL6B	DMSO
4	Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan	Saori Fujishima	2,5-Diaminotoluene	95-70-5	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#QFIJE	DMSO
5	Astellas Pharma Inc.	Mika Yamamoto, Naoko Otani	HC Blue No.2	33229-34-4	SIGMA-ALDRICH, Lot#STBF9635V	DMSO
6	BoZo Research Center Inc.	Takayuki Fukuda, Maki Nakamura, Ryoichi Nishimura	8-Hydroxyquinoline	148-24-3	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#5PDSI-RB	DMSO
7	BioSafety Research Center Inc.	Maya Ueda	Iodoform	75-47-8	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Lot#PDH1055	DMSO
8	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd	Masayuki Mishima, Kaori Matsuzaki, Akira Takeiri, Kenji	4-Nitroanthranilic acid	619-17-0	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#AGM01-AGMQ	DMSO
9	TEIJIN PHARMA LIMITED	Yuki Okada, Takafumi Kimoto	1-Nitronaphthalene	86-57-7	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#BGF8A-MD	Ethanol
10	LSI Medience Corporation	Munehiro Nakagawa, Shuichi Hamada, Akihiko Kajiwara	4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-9	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#NMEDH	DMSO

**Table 2. 被験物質の処理例**

細胞液(約 4×10 <sup>6</sup> cells/mL)	5 mL
RPMI-0 (無血清培地)	3.3 mL
S9 mix あるいは 150 mM KCl	1.5 mL
被験液	0.2 mL
処理容量	10 mL

**Table 3. 陽性対照物質の情報**

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

**Table 4. Summary of Results of TK gene mutation assay for the 10 chemicals**

No.	Chemical Name	CAS No.	TK mutation assay <sup>*1</sup>			Bacterial reverse mutation assay		MLA (TK gene locus)	
			Without S9	With S9	Long term	Without S9	With S9	Without S9	With S9
1	4-(Chloroacetyl)-acetaniilide	140-49-8	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	No data	
2	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	6959-47-3	Pos	Pos	NP	Pos	Pos	Pos	Pos
3	2,6-Diaminotoluene	823-40-5	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	No data
4	2,5-Diaminotoluene	95-70-5	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Inconclusive <sup>*2</sup>	
5	HC Blue No.2	33229-34-4	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
6	8-Hydroxyquinoline	148-24-3	Neg	Pos	NP	Neg	Pos	Pos	No data
7	Iodoform	75-47-8	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	No data	
8	4-Nitroanthranilic acid	619-17-0	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Equivocal <sup>*3</sup>	Pos
9	1-Nitronaphthalene	86-57-7	Pos	Pos	NP	Pos	Pos	No data	
10	4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-9	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos

\*1 performed in this study. NP; Not applicated.

\*2 examined as toluene-2,5-diamine sulfate. The required toxicity (10-20% survival compared to the concurrent negative controls) was not reached in the experiments with S9mix

\*3 Significant difference only at the highest dose of 1200 µg/mL

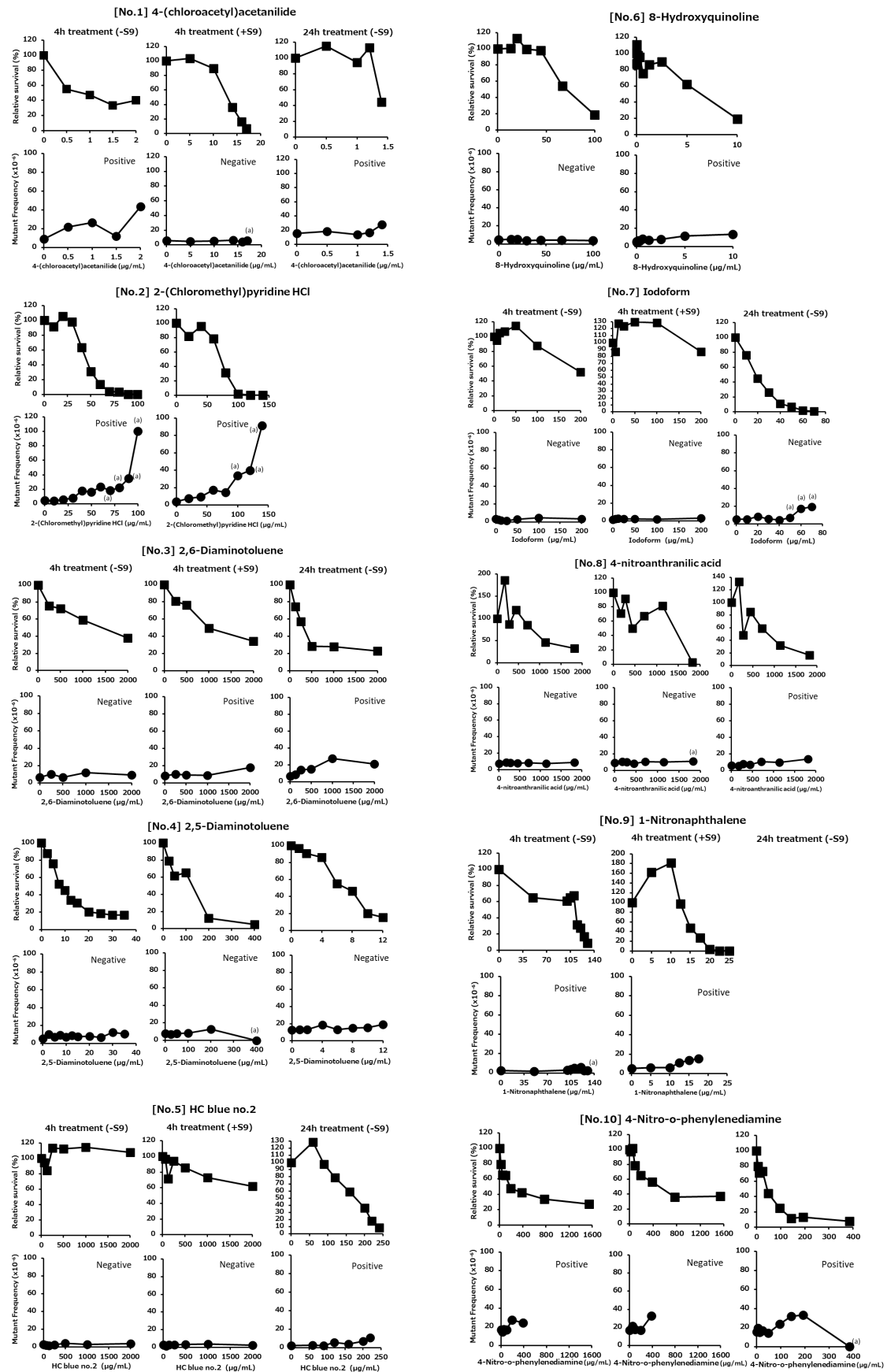


Figure 1. 各研究施設が実施した10種類の各化学物質のTK6アッセイにおける相対生存率と変異頻度

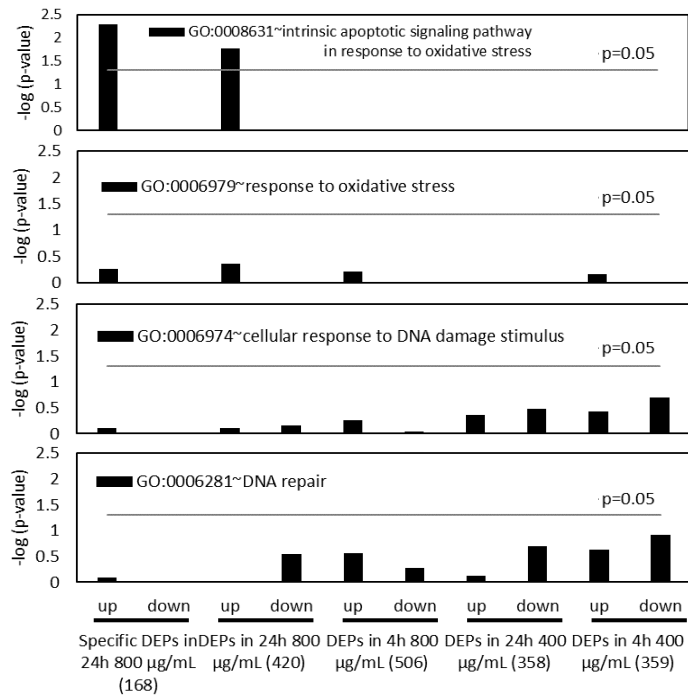


Figure 2. 4-ニトロアントラニル酸に 24 時間曝露された TK6 細胞の標的遺伝子オントロジー分析

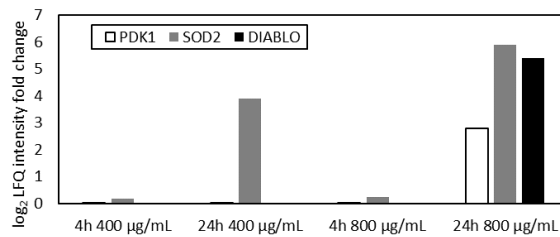


Figure 3. 4-ニトロアントラニル酸の 24 時間処理による酸化ストレスに応答した内因性アポトーシスシグナル伝達経路のタンパク質発現レベル

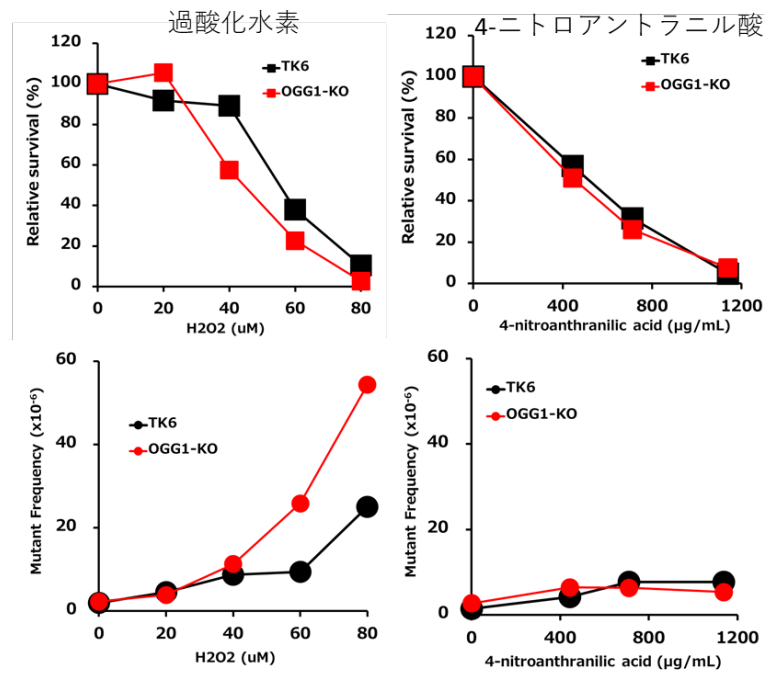


Figure 4. OGG1 欠損細胞を用いる TK6 アッセイ(24 時間処理)

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

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

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

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

研究要旨

遺伝毒性発がん物質であるアクリルアミド (AA) をモデル化合物として、DNA 初期損傷 (DNA 付加体形成) と遺伝子突然変異の量的相関を明らかにするため *gpt delta* マウスを用いたトランスジェニック遺伝子突然変異試験 (TGR 試験) を行った。AA を 28 日間飲水投与したマウス肝臓において DNA 付加体量が用量依存的に直線的に増加したのに対して、遺伝子突然変異頻度は低用量群 (30 ppm) で有意に増加するが頭打ちの用量反応性を示した。ベンチマークドーズの信頼区間 (BMDL-BMDU) は DNA 付加体量、変異頻度、発がんにおいてほぼ重なっていた。遺伝毒性発がん AOP において、分子的初期イベント (DNA 付加体形成) と下流のキーイベント (遺伝子突然変異誘発) が定性的に相関するが、用量反応性が異なる特徴を示したことから、AA 発がんのメカニズムは特定の DNA 付加体による遺伝毒性 MoA のみでは十分説明できない可能性が示唆された。遺伝毒性と発がん AOP の研究において発がん試験データが豊富なラットを用いた試験系は重要であり、従来の *gpt delta* ラットより  $\lambda$  EG10 ベクターの回収効率が大幅に高い新規 *gpt delta* ラットの作出と評価を行った。EG10 をホモに持つ新規 *gpt delta* ラット (Wistar Hannover 系統) は、従来の F344 *gpt delta* ラット (EG10 ヘテロ) と比較して 5 倍高い回収効率を示した。BaP および ENU 投与により、肝臓と骨髄の *gpt* 点突然変異頻度は有意に増加した。 $\lambda$  EG10 はラットゲノム 1 番染色体に多コピー挿入されていた。新規 *gpt delta* ラットは *in vivo* 遺伝子突然変異試験に有用であることが示唆された。

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

A. 研究目的

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

メカニズムを関連づけて説明する手法 (AOP)」を取り入れた遺伝毒性評価系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。化学発がんの分子的初期イベントである DNA 初期損傷 (DNA 付加体形成) およびこれに続くキーイベントである遺伝子突然変異誘発に関して、これら



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

## B. 研究方法

### 1. AA 投与 *gpt delta* マウスの遺伝毒性と用量相関の解析

雄 9 週齢の *gpt delta* マウス (C57BL/6J) に AA (300, 100, 30 ppm) を 28 日間飲水投与した。(AA 100 ppm は 1.4 mM に相当。) 投与終了後 3 日目に組織を採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。各群 5 匹を DNA 付加体測定および遺伝子突然変異試験に使用した。肝臓、肺、精巣からゲノム DNA を調製し、LC-MSMS による DNA 付加体 (N7-GA-Gua) 量および *gpt* 遺伝子突然変異体頻度の測定を行い用量反応データを取得した。得られた用量反応データから PROASTweb (<https://proastweb.rivm.nl/>) を用いてベンチマークドーズを算出した。用量反応曲線において有意な影響があるとされる反応レベル (BMR: 今回は 10%、50% の 2 通りで計算) をもたらす用量をベンチマークドーズ (BMD) という。BMD は 95% 信頼区間 (BMDL-BMDU) の範囲として示した。計算にあたり、model averaging は有効とした。また DNA 付加体量の陰性対照値がゼロの場合は対数変換できず計算ができないため、

LC-MSMS の検出限界値  $170/10^8$  base を陰性対照値として用いた。AA の発がん性のベンチマークとして、食品安全委員会評価書 (2016) で採用している 2 年間マウス発がん試験 (NTP2012) で最も感受性が高かった雄 *harderian gland tumor* のデータを用いた。

### 2. 新規 *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性試験の評価

現行の *gpt delta* マウス・ラットで用いられている  $\lambda$  EG10 シャトルベクターをゲノムに導入した新規 *gpt delta* ラット (Wistar Hannover 系統) を作出した (SLC 社が実施)。新系統が  $\lambda$  EG10 をホモに持つことを PCR で確認した。従来の *gpt delta* ラット (ヘテロ系統) の 5 倍高いパッケージング効率を示した新系統 (homo) を用いて変異原物質投与実験を行った。雌雄各 5 匹の *gpt delta rat (homo)* にベンツピレン

(BaP) (0, 62.5, 125 mg/kg) を 28 日間強制経口投与し、最終投与の 3 日後に組織を採取して凍結保存 ( $-70^{\circ}\text{C}$  以下) した。陽性対照として ENU (50mg/kg) を 5 日間連続で腹腔内投与し、最終投与から 26 日後に組織採取して凍結保存した。動物数が限られていたため、実験は ENU 投与群、BaP 投与群の雄、BaP 投与群の雌の 3 回に分けて実施された。肝臓と骨髄からゲノム DNA を調製し、*gpt* アッセイを行い点突然変異頻度を測定するとともに、得られた変異体のシーケンス解析を実施して変異スペクトルの解析を行った。また、次世代シーケンサーを用いてラットゲノム中の  $\lambda$  EG10 挿入部位を決定し、導入コピー数を推定した。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### 1. AA 投与 *gpt delta* マウスの遺伝毒性と用量 相関の解析

雄 *gpt delta* マウスに AA を 28 日間飲水投与した。最高用量 300 ppm 群において有意な体重増加抑制が認められた。AA 30, 100, 300 ppm 投与群の肝臓、肺、精巣における DNA 付加体形成量と *gpt* 突然変異体頻度を、AA 飲水量から換算した AA 投与量に対してプロットした結果を図 1 に示した。DNA 付加体量はいずれの組織においても用量依存的に直線的な増加を示した。肝臓の変異頻度は陰性対照群と比較して 2~3 倍有意に増加したが、100, 300 ppm 群では 30 ppm 群とほぼ同様の値を示し、頭打ちの用量反応曲線を示し、用量依存性は明らかでなかった。AA 投与群の肺における変異頻度は肝臓と同等であったが、陰性対照群の標準偏差が大きく統計学的に有意な増加は確認できなかった。精巣の変異頻度は 3 ppm 投与群で約 2 倍、300 ppm 群で約 3 倍の有意な増加が見られた。

得られた用量反応データを用いてベンチマークドーズを算出した結果を図 2 に示した。BMD 信頼区間 (BMDL-BMDU) は付加体量、変異頻度、発がん概ね重なっていた。肝臓と精巣の変異頻度については BMDL 値が極端に低く、PoD の妥当性に疑問がある。肺では用量依存的な変異頻度の増加が確認できず BMD は算出できなかった。

### 2. 新規 *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性試験 の評価

$\lambda$  EG10 をホモに持つ新規 *gpt delta* ラットのレポーター遺伝子回収効率率は現行ラット (ヘテロ) と比較して約 5 倍高かった。新規 *gpt delta* rat (homo) に BaP を 28 日間経口投与した。陽性対照として ENU (50mg/kg) を 5 日間腹腔内投与した。肝臓と骨髄からゲノム DNA を調製し、*gpt* 点突然変異頻度を測定した。突然変異頻度の結果を図 3 に示した。BaP 投与群の肝臓と骨髄において、*gpt* 突然変異体頻度は用量依存的に有

意に増加した。また、ENU 投与群でも有意に増加した。BaP 投与群の肝臓では雌の変異頻度がやや高い傾向があったが、骨髄および ENU 投与群では雌雄差はみられなかった。肝臓由来の *gpt* 変異体のシーケンス解析を行い、変異スペクトル解析を実施した。無処理群では G:C to A:T, G:C to T:A および 100 bps 以下の欠失が主であった。BaP 投与群では G:C to T:A 変異の有意な増加がみられた。ENU 投与群では A:T 塩基対の塩基置換変異の有意な増加がみられた。

また、次世代シーケンサーを用いてラットゲノム中の  $\lambda$  EG10 挿入部位を決定し、導入コピー数を推定した。 $\lambda$  EG10 はラット 1 番染色体の *B3gnt6* 遺伝子のイントロン部分にマルチコピーで導入されていた。挿入部位には短い欠失、挿入、逆位がみられた。挿入された  $\lambda$  EG10 のコピー数は 30~44/haploid と推定された。

## D. 考察

AA は肝臓のチトクローム P450 (CYP2E1) によってグリシドアミドに代謝され、DNA 付加体 (N7-dG-GA 等) を形成する。AA の発がん AOP は、分子的初期イベント (MIE) として DNA 付加体の形成、キーイベント (KE) として遺伝子突然変異の誘発、有害事象 (AO) として発がんを設定する。*gpt delta* マウスを用いた AA 飲水投与実験の結果、AA 投与群の肝臓における *gpt* 突然変異体頻度は陰性対照群の約 3 倍に増加したが、3 用量群で同程度の変異体頻度を示し、用量依存性は明確でなかった。AA の付加体量が投与量に依存して増加するのに対して、遺伝子突然変異頻度は有意に増加するが 30 ppm 以上では頭打ちの用量反応性を示すことが示唆された。遺伝毒性発がん AOP において、MIE である DNA 付加体形成と下流の KE である遺伝子突然変異誘発が定性的に相関する一方で、用量反応性が異なる特徴を示す場合があることが示唆された。一方で、発がん性標的組織において用量依存的な発がんがみられることから、AA 発がんのメカニズムは特定の DNA 付加体による遺伝

毒性 MoA のみでは十分説明できない可能性が示唆された。他の要因としては、マイナーな付加体、非遺伝毒性 MoA、系統差の影響などが考えられる。BMD 信頼区間は DNA 付加体量、変異頻度、発がんについて概ね重なっていたが、変異頻度については BMDL 値が極端に低かった。これは動物実験の用量設定に対して想定される PoD がより低用量であること、および各用量群の標準偏差が大きいことを示唆している。この問題は BMR に大きな値を設定することでやや改善された。(例えば BMD10 より BMD50 の方が信頼区間が狭い。) 変異頻度の増加幅が小さく、用量依存性が明瞭でない場合、BMD 算出の妥当性には注意する必要がある。AA の発がん標的の一つは肺だが、今回、変異頻度の有意な用量反応データが得られず BMD が算出できなかった。今後は他の発がん標的における PoD との比較を検討予定である。

遺伝毒性と発がんの量的相関の研究においては発がん試験データが豊富なラットを用いた TGR 試験が重要だが、従来の *gpt delta* ラットはレポーター遺伝子の回収効率が低い欠点があった。そこで、レポーター遺伝子の導入コピー数が多く、かつレポーター遺伝子をホモに持つ新規 *gpt delta* ラットの作出と評価を行った。Wistar Hannover 系統の  $\lambda$  EG10 ホモ化 *gpt delta* ラットは従来の F344 *gpt delta* ラット (ヘテロ) 系統と比較して 5 倍高い回収効率を示した。この結果は TGR 試験の効率化をもたらすものと期待される。BaP および ENU を投与し、突然変異頻度を測定した結果、肝臓と骨髄の *gpt* 点突然変異頻度は有意に増加し、従来の *gpt delta* ラットと同等の感受性を示した。BaP に特徴的な G:C to T:A 変異および ENU に特徴的な A:T 塩基対の塩基置換変異の有意な増加がそれぞれ確認された。 $\lambda$  EG10 トランスジーンはラットゲノムの 1 番染色体に 30~44 コピー挿入されており、新規 *gpt delta* ラット (homo) は *in vivo* 遺伝子突然変異試験に有用であることが示唆された。今後は、欠失変異を検出する Spi-アッセ

イの検討を行う予定である。

## E. 結論

AA 投与 *gpt delta* マウスの肝臓における *gpt* 突然変異体頻度は投与群で有意に増加したが、DNA 付加体量および発がんとの用量相関性は低かった。AA 発がんメカニズムは特定の DNA 付加体による遺伝毒性 MoA のみでは十分説明できない可能性が示唆された。TGR 試験の効率化のため、従来の系統と比べてレポーター遺伝子回収効率が低い新規 *gpt delta* ラット (homo) を作出し、*in vivo* 遺伝毒性試験に有用であることを示した。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Masumura K, Yatagai F, Ochiai M, Nakagama H, Nohmi T. Effects of the *scid* mutation on X-ray-induced deletions in the brain and spleen of *gpt delta* mice. *Genes Environ.* 2020;42:19.
2. Chen R, You X, Cao Y, Masumura K, Ando T, Hamada S, Horibata K, Wan J, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y. Benchmark dose analysis of multiple genotoxicity endpoints in *gpt delta* mice exposed to aristolochic acid I. *Mutagenesis.* 2020;geaa034.
3. Ishii Y, Takasu S, Grúz P, Masumura K, Ogawa K, Nohmi T, Umemura T. The role of DNA polymerase  $\zeta$  in benzo[*a*]pyrene-induced mutagenesis in the mouse lung. *Mutagenesis.* 2021;geab007.
4. Hagio S, Tsuji N, Furukawa S, Takeuchi K, Hayashi S, Kuroda Y, Honma M, Masumura K. Effect of sampling time on somatic and germ cell mutations induced by acrylamide in *gpt delta* mice. *Genes*

Environ. 2021;43:4.

## 2. 学会発表

1. 増村健一，安東朋子，鶴飼明子，藤原聖，横瀬重雄，高木久宜，能美健彦，本間正充：遺伝子突然変異試験において高いレポーター遺伝子回収効率を実現する新規 *gpt delta* ラット. 第79回日本癌学会学術総会(2020.10)
2. 増村健一，安東朋子，石井雄二，杉山圭一，本間正充：アクリルアミド投与 *gpt delta* マ

ウスを用いた DNA 付加体と点突然変異の用量相関に関する研究. 日本環境変異原学会第49回大会 (2020.11)

## H. 知的所有権の取得状況

なし

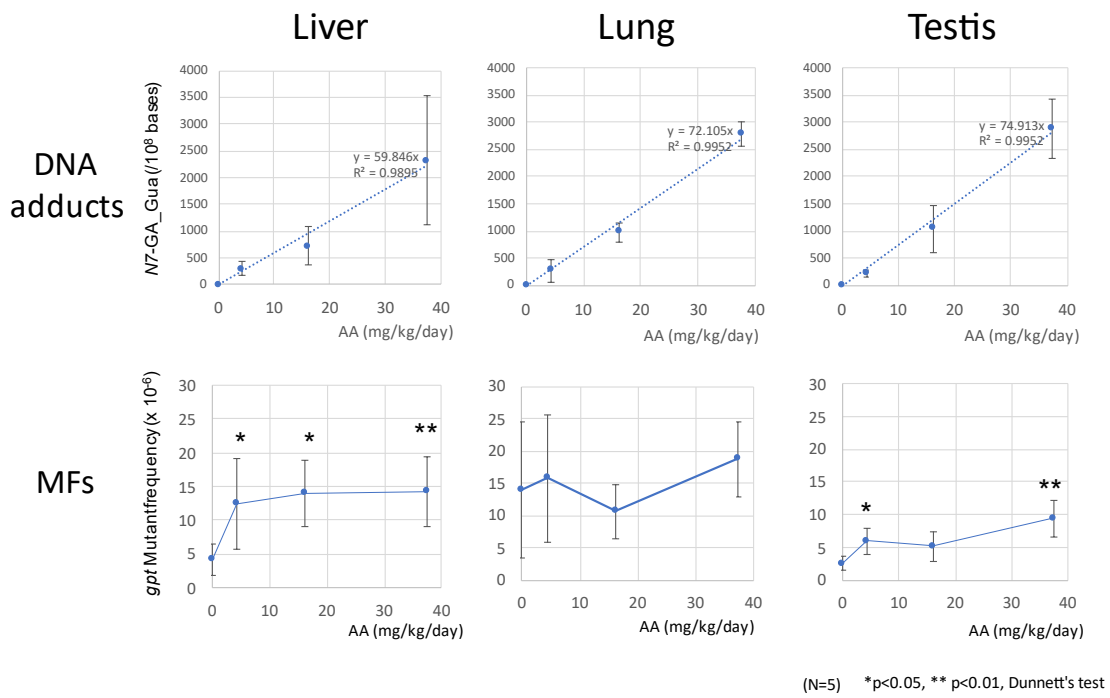


図 1. AA 投与マウス組織における DNA 付加体量と *gpt* 突然変異体頻度

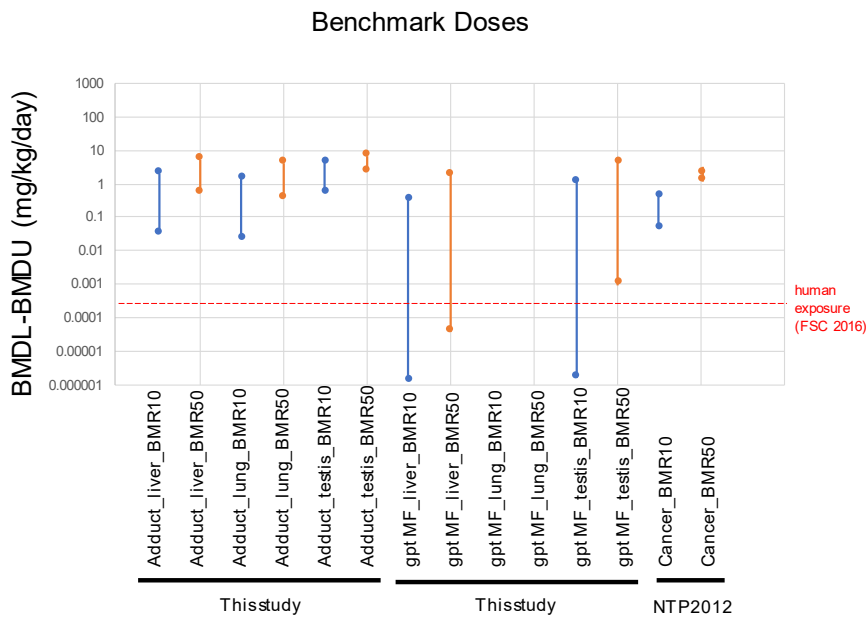


図 2. ベンチマークドーズ法による PoD 算出 (BMD10 および BMD50)

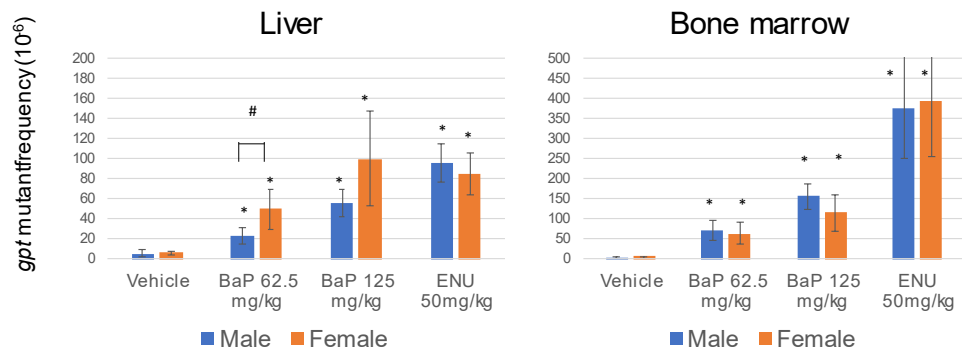


図3. 新規 *gpt delta* ラット (homo) の BaP, ENU 誘発 *gpt* 突然変異体頻度

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

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

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

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

研究要旨

食品香料として用いられていた acetamide はラット肝発がん性を有する。FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）は、その機序に遺伝毒性機序の関与が否定できないという理由から添加物としての使用は不適切としたものの、種々の遺伝毒性試験は陰性であることから、その関与は未だ明らかになっていない。本研究では、*gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験を用いて、acetamide の包括的評価を実施した。本年度は acetamide を 0.625, 1.25 および 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与した F344 系 *gpt delta* ラットの肝臓における発がん性評価と小核試験を実施した。さらに、肝臓小核試験の結果の有効性を確認するため標準プロトコールに従い F344 ラットに acetamide を 4 週間混餌投与し、肝臓および骨髄小核試験を実施した。肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の数および面積は発がん用量である 1.25% から有意に上昇した。肝臓小核試験では通常の小核に加え大型の小核を有する肝細胞が検出され、どちらも 1.25% から有意に増加した。標準プロトコールの肝臓小核試験でも同様の変化が認められたが、骨髄小核試験は陰性であった。さらに、セントロメア FISH 法により大型の小核に染色体が含まれることを確認した。以上より、acetamide は肝臓特異的に染色体異常を誘発し、その機序には肝臓における代謝活性化が寄与すると考えられた。また、本研究により GST-P 陽性細胞巢を用いた発がん性評価の有効性に加え、肝臓小核試験が *in vivo* における染色体異常の検出に有用であること、包括試験への組み込みが可能であることが確認された。

A. 研究目的

合成香料には個別指定品目に加えて、化学構造から使用が認められているいわゆる「18 類」と呼ばれる 3000 を超える品目が例示されている。しかし、その「18 類」の中の一つ 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene は、明確な *in vivo* 遺伝毒性を示すことが明らかとなり、2013 年に欧米および我が国においても使用禁止処置がとられた。また、estragole, methyleugenol, safrole 及び elemicin といったフェノールエーテル類の天然香気成分は、ラット肝発がん性を有し、その機

序に直接的な DNA 損傷を介した突然変異誘発性が関与することを我々は明らかにしてきている<sup>1-4)</sup>。このように、指定対象の香料についてもその安全性が十分に担保されているとは言えない。国際的な食品添加物の安全性評価委員会である FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）では、香料の評価において、毒性学的懸念の閾値（TTC）と暴露マージン（MOE）を駆使し、多くの場合は実際の試験データを用いずに数多くの香料を評価している。しかしそれは、本来、遺伝毒性がないことが前提とさ

れている。一方、我が国では、90日間試験と遺伝毒性試験が必須とされてきた。このような違いから、EU等におけるポジティブリスト制度導入の動きともあいまって、我が国で現在使用されている香料の安全性を可及的速やかに確認する必要がある。

そこで我々は、任意の臓器における *in vivo* 変異原性の検索が可能なレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いることで、同一個体において一般毒性、遺伝毒性及び発がん性に関する情報を短期間で得ることが出来る包括的試験法を開発し、alkoxybenzene 化合物や furan 誘導体の評価を行ってきた<sup>3-5)</sup>。本研究では JECFA で登録されている食品香料または過去に登録されていた香料の中から、ヒト健康影響が懸念される物質について一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験による評価を実施し、ヒトリスク評価に資するデータを提供するとともに、食品添加物の安全性評価における本試験法の有用性を確認することを目的とした。

Acetamide は過去に食品香料として用いられてきたが、ラット肝臓において強い発がん性を有する。その発生頻度の高さから、JECFA は本剤の発がん性に遺伝毒性メカニズムの関与が疑われるとし、食品添加物としての使用は不適切と判断した<sup>6)</sup>。一方、遺伝毒性試験では、コメットアッセイにおいて陽性の結果があるものの、Ames 試験及び *in vivo* 小核試験を含む多数の試験においていずれも陰性であることから、その発がん過程における遺伝毒性機序の関与の有無は明らかになっていない。また、acetamide はタバコ煙中や、牛乳、コーヒーといった食品中に含まれることから<sup>7,8)</sup>、食品を介して非意図的に暴露されており、ヒト健康への影響が懸念されるが、毒性情報は乏しく、ヒトリスク評価に資する情報の取得が喫緊の課題である。

昨年度までに、雄性 6 週令の *gpt delta* ラットに acetamide を 0.625、1.25 および 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与し、一般毒性評価

及び遺伝毒性評価を実施した。その結果、一般毒性評価では acetamide が 1.25% から肝臓及び造血器系組織に毒性影響を示し、無毒性量は 0.625% (394 mg/kg 体重/日に相当) であることを明らかにした。遺伝毒性評価では acetamide が発がん標的臓器においても変異原性を示さないことを明らかにした。本年度は発がん性評価としてラット肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の検索と、新たに遺伝毒性評価として染色体異常を検出する肝臓小核試験を実施した。さらに、包括試験の 13 週間投与における小核試験で得られたデータの有効性を確認する目的で、標準プロトコールである 4 週間投与における acetamide の肝臓および骨髄小核試験を実施し、結果を比較した。

## B. 研究方法

### B-1. 材料及び試薬

Acetamide は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。

### B-2. Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験

#### B-2-1 動物実験

動物は 5 週令の雄性 F344 系 *gpt delta* ラット 40 匹を日本エスエルシー株式会社（静岡）から購入し、一週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社（東京）のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飲料水として水道水を試験期間中自由に摂取させた。40 匹の F344 系 *gpt delta* ラットを各群 10 匹に配し、対照群と低用量、中間用量及び高用量群の計 4 群を設けた。Acetamide の投与は用量設定試験の結果に基づいて、高用量



を 2.5%、中間用量、低用量群は公比 2 で除した 1.25%、0.625%とし、粉末飼料に混じ、13 週間自由摂取させた。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施し、体重及び摂餌量測定は週 1 回実施した。剖検の 16 時間前より絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。

#### B-2-2. 発がん性評価

GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色には、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋された肝組織標本を用いて作成した切片を用いた。キシレン、無水エタノールにて脱パラフィンの後、3% $H_2O_2$ にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、1次抗体として MBL ライフサイエンス社製抗 GST-P ラビットポリクローナル抗体を用い、室温で 1 時間インキュベートした。Phosphate-buffered saline にて洗浄後、2次抗体としてニチレイバイオサイエン社製ヒストファイン シンプルステイン（ウサギ第一抗体用）にて 30 分間インキュベートした。発色には diaminobenzidine を用いた。

#### B-2-3. 遺伝毒性評価（肝臓小核試験）

肝臓小核試験には 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した肝組織を用いた<sup>9)</sup>。2~3 mm 大にカットした肝組織 10 個を 12N 水酸化カリウム溶液に入れ、室温で 16 時間インキュベーションし、洗浄後、水でホモジナイズした。遠心分離後、10%中性緩衝ホルマリンで洗浄し、固定した。細胞懸濁液を SYBR Gold で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。2000 個の肝細胞（HEPs）をカウントし、そのうち小核を有する肝細胞（MNHEPs）の割合を算出した。主核の直径の 1/4 以下の物を通常の小核（MN）、1/2~1/4 の物を大型の小核（LMN）としてカウントした。

### B-3. Acetamide の *in vivo* 染色体異常試験

#### B-3-1 動物実験

動物は 5 週齢の雄性 F344 ラット 30 匹を日本エスエルシー株式会社（静岡）から購入し、一週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度  $24 \pm 1^\circ C$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社（東京）のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飲料水として水道水を試験期間中自由に摂取させた。30 匹の F344 ラットを各群 5 匹に配し、対照群と 0.625% 群、1.25% 群及び 2.5% 群、陽性対照として mitomycin C 及び colchicine 投与群の計 6 群を設けた。Acetamide は粉末飼料に混じ、4 週間自由摂取させた。Mitomycin C 及び colchicine は 0.25 及び 0.6 mg/kg/day の用量で 2 週間腹腔内投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施し、体重及び摂餌量測定は週 1 回実施した。剖検の 16 時間前より絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。

#### B-3-2. 遺伝毒性評価（骨髄及び肝臓小核試験）

剖検時に採取した左大腿骨の両端を切断後、非働化ウシ胎児血清（FBS）で洗い出し、骨髄細胞を採取した。採取した細胞は遠心分離し、細胞濃度を調整した後、細胞懸濁液を用いてスライドガラス状に塗抹し、風乾後メタノール固定した。観察時にはアクリジン・オレンジで染色し蛍光顕微鏡で観察した。4000 個の多染性赤血球をカウントし、そのうち MN を有する多染性赤血球の割合を算出した。

肝臓小核試験については B-2-3 を参照。

### B-3-3. セントロメア FISHによる小核における染色体の検出

ラットのサテライト DNA 配列のプロローブを用いてラット染色体のセントロメアの染色を行った<sup>10)</sup>。プライマーには 5'-TCCCCGCTTGGAACGAAGAGA-3' 及び 5'-TTCTATATCCCGAACAGTCC-3' を用いた。肝細胞懸濁液をスライドガラスに塗抹後メタノール固定し、-20°C で保存した。プロテアーゼ処理後、2xSSC/70%ホルムアミドで変性させ、エタノールで脱水した。digoxigenin 標識した DNA プロローブを含むハイブリダイゼーションバッファーを滴下し、80°C で 10 分間加熱した後、37°C で 16 時間インキュベートした。洗浄後、抗 digoxigenin マウスモノクローナル抗体を室温で 2 時間処理し、Red-X 標識抗 mouse 抗体で 10 分間処理した後、VECTASHIELD 社製 mounting medium with DAPI で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

#### (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### C-1. Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験

#### C-1-1. 発がん性評価

GST-P 陽性細胞巢の一部は病理組織学的検索において認められた変異肝細胞巢と一致して発現し、その数及び面積は発がん用量である 1.25%から有意に増加した (Fig.1)。

#### C-1-2. 遺伝毒性評価 (肝臓小核試験)

MNHEPs 及び LMNHEPs は 1.25%から有意に上昇した。なお、LMNHEPs の頻度は MNHEPs よりも高値を示した (Fig.2)。

#### C-2. Acetamide の *in vivo* 染色体異常試験

骨髄小核試験では陽性対照である mitomycin C 及び colchicine を投与したラットにおいて、小核を有する多染性赤血球の増加が認められたのに対し、acetamide 投与群において変化は認められなかった (Fig.3)。肝臓小核試験では陽性対照である mitomycin C を投与したラットにおいて MNHEPs が、colchicine を投与したラットにおいて LMNHEPs の増加が認められ、acetamide 投与群では 1.25%から MNHEPs 及び LMNHEPs の有意な増加が認められた (Fig.4)。なお、4 週投与における MNHEPs 及び LMNHEPs の割合は、13 週投与に比して高値を示した。

FISH 法による解析の結果、acetamide 及び colchicine に誘発された LMNs において染色体の存在が確認された (Fig.5)。

## D. 考察

肝臓の GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の有意な増加は 1.25%から認められ、acetamide の肝発がん性と一致した。このことから、本法が包括的毒性試験における発がん性評価に有効であることを確認した。また、GST-P 陽性細胞巢が検出される条件下においても、*in vivo* 変異原性試験が陰性だった事実は、acetamide の肝発がん性に突然変異誘発性が寄与しないことを支持するものと考えられた。

肝臓小核試験で認められた LMNHEPs は、前年度実施した病理組織学的検索にお

いて肝臓で高頻度に認められた細胞質内封入体と同一と考えられた。FISH 分析の結果、acetamide により誘発された LMNs には、異数性誘発物質である colchicine によって誘発された LMNs と同様に染色体が含まれることが確認され、acetamide は異数性誘発物質であることが示唆された。肝臓小核試験の結果、MNHEPs 及び LMNHEPs はいずれも発がん用量である 1.25% から有意に増加し、同様の結果は標準プロトコール（4 週間投与）で実施した肝臓小核試験においても認められたことから、染色体異常が acetamide の肝発がん性に寄与することが示唆された。一方、骨髄小核試験は陰性であったことから、acetamide は肝臓に選択的に染色体異常を誘発し、その機序には肝臓における代謝活性化が寄与すると考えられた。一方、肝臓小核試験の標準プロトコールとして推奨されている 4 週間投与に比べ、13 週間投与では MNHEPs 及び LMNHEPs の割合がわずかに減少したものの、本法が 13 週間投与した肝臓でも染色体異常誘発性を評価できる十分な検出感度を有することを確認した。

#### E. 結論

Acetamide が肝臓特異的に小核を形成する異数性誘発物質であることを明らかにし、その染色体異常が肝発がん性に寄与することが示唆された。一方、*gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験における発がん性評価では、GST-P 陽性細胞巢の検索が有効であることを確認した。さらに、肝臓小核試験は *in vivo* における染色体異常誘発性を検出する有用な手法であり、包括試験への組み込みも可能であることを確認した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究成果

##### G-1. 発表論文

Nakamura K, Ishii Y, Takasu S, Nohmi T, Shibutani M, Ogawa K. Lack of *in vivo* mutagenicity of acetamide in a 13-week comprehensive toxicity study using F344 *gpt delta* rats. *Toxicol. Sci.* 177, 431-440 (2020).

##### G-2. 学会発表

- 1) 中村賢志, 石井雄二, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「Acetamide のラット肝発がん過程における染色体異常及び DNA 損傷の関与」第 47 回日本毒性学会学術年会(2020 年 6 月)
- 2) 中村賢志, 石井雄二, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「染色体異常により誘発される小核形成を介した acetamide の肝発がん機序の検討」日本環境変異原学会第 49 回大会(2020 年 11 月)
- 3) 中村賢志, 石井雄二, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「染色体異常を起点とする acetamide の肝発がん機序の検討」第 37 回日本毒性病理学会学術集会(2021 年 2 月)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### 参考文献

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

- T, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K, Umemura T, Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with *gpt* delta rats. *Toxicology*, 290, 312-321.
- 4) Jin M, Kijima A, Hibi D, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kuroda K, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T, *In vivo* genotoxicity of methyleugenol in *gpt* delta transgenic rats following medium-term exposure. *Toxicol. Sci.* 131, 387-394.
  - 5) Hibi D, Yokoo Y, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, Kijima A, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T, Lack of genotoxic mechanisms in early-stage furan-induced hepatocellular tumorigenesis in *gpt* delta rats. *J. Appl. Toxicol.*, 37, 142-149 (2017).
  - 6) JECFA : WHO Food Additives Series, Evaluation of Certain Food Additives, Report of 65th JECFA meeting, 2005
  - 7) Diekmann J, Wittig A, Stabbert R, Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acrylamide and acetamide in cigarette mainstream smoke after on-column injection. *J. Chromatogr. Sci.*, 46, 659-663 (2008).
  - 8) Vismeh R, Haddad D, Moore J, Nielson C, Bals B, Campbell T, Julian A, Teymouri F, Jones AD, Bringi V, Exposure assessment of acetamide in milk, beef, and coffee using xanthidrol derivatization and gas chromatography/Mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 66, 298-305 (2018).
  - 9) Hamada S, Shigano M, Kawakami S, Ueda M, Sui H, Yamada K, Haio S, Momonami A, Maeda A, Terashima Y, Ohyama W, Morita T, Hayashi M, Evaluation of the novel liver micronucleus assay using formalin-fixed tissues. 41, 13 (2019).
  - 10) Takeiri A, Motoyama S, Matsuzaki K, Harada A, Taketo J, Katoh C, Tanaka K, Mishima M, New DNA probes to detect aneuploidy in rat bone marrow micronucleated cells by a pan-centromeric FISH analysis. *Mutat. Res.* 755, 73-80 (2013).

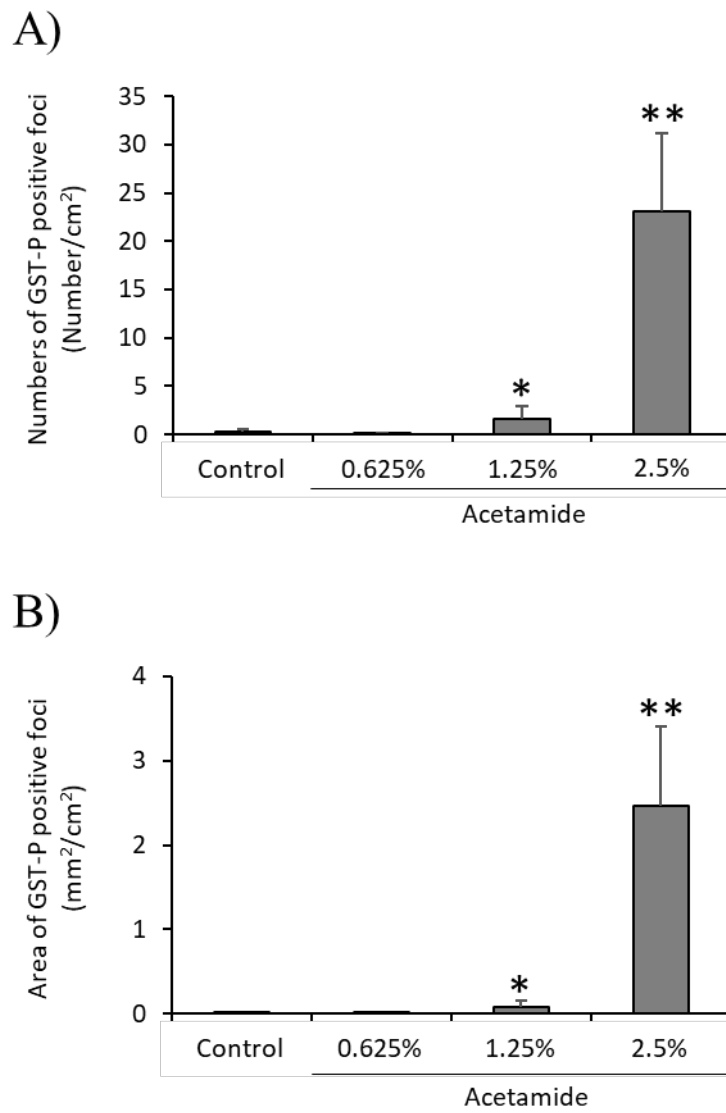


Figure 1. Number (A) and area (B) of GST-P-positive foci in the livers of F344 *gpt* delta rats given a diet containing acetamide for 13 weeks. Data represent the means  $\pm$  SDs. \*, \*\*: Significantly different from the control group at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

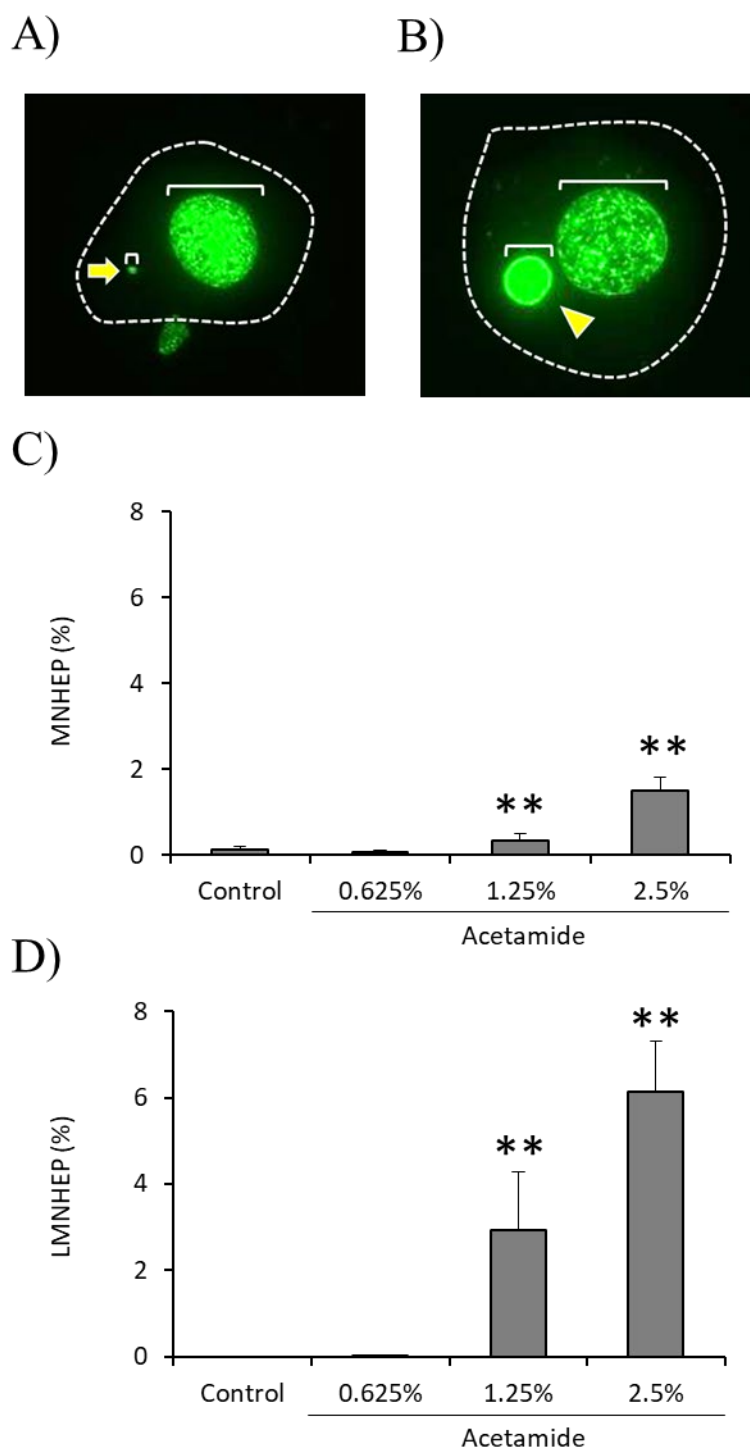


Figure 2. *in vivo* micronucleus assay in the livers of F344 *gpt* delta rats given a diet containing acetamide for 13 weeks. Representative photos of micronucleated hepatocytes (MNHEPs) (A) and large micronucleated hepatocytes (LMNHEPs) (B) in *in vivo* liver micronucleus assay (yellow arrow; micronucleus). Dashed line indicates cell border. (B) The quantification of ratio MNHEP/HEP (C) and LMNHEP/HEP (D). \*\*: Significantly different from the respective control groups at  $p < 0.01$ , respectively.

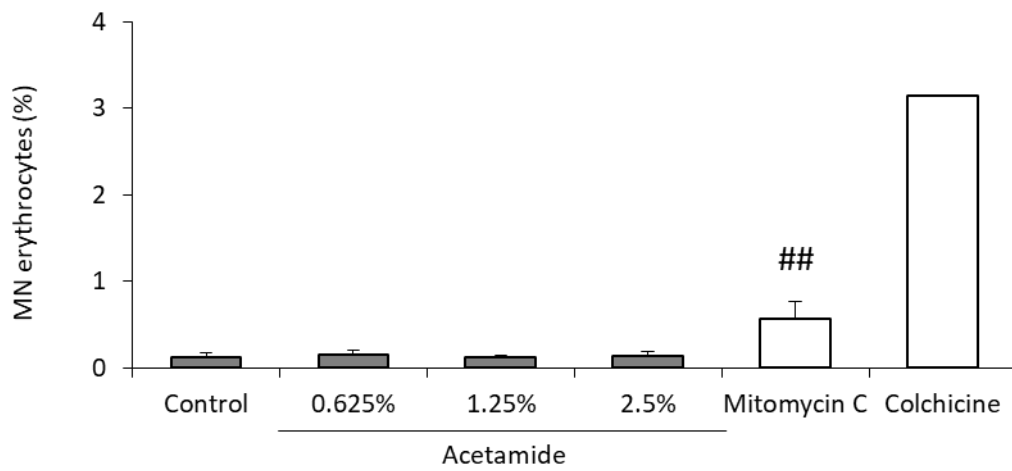


Figure 3. *in vivo* micronucleus assay in the erythroblasts of F344 *gpt* delta rats given a diet containing acetamide for 4 weeks. The quantification of ratio micronucleated erythroblast/erythroblast. ##: Significantly different from the respective control groups at  $p < 0.01$ , respectively.

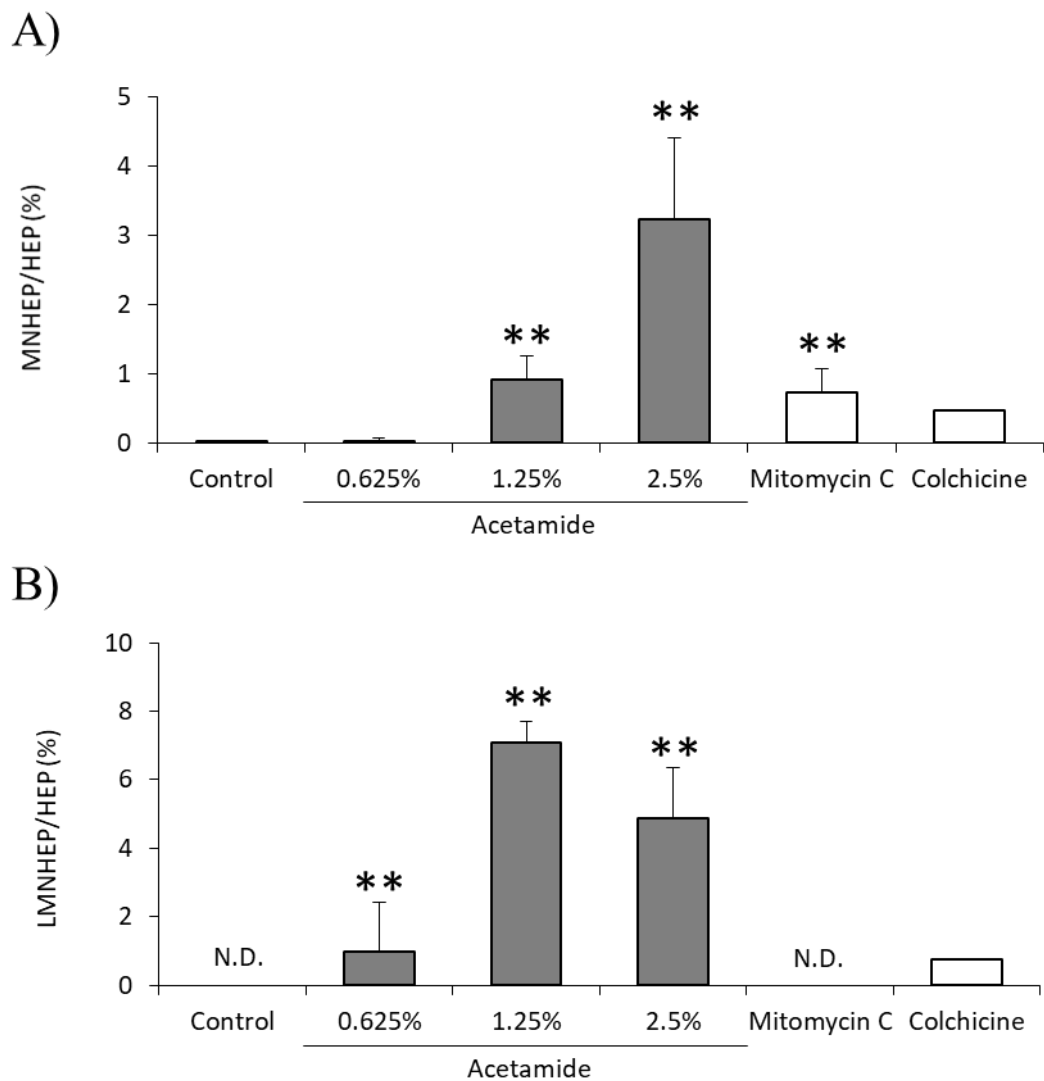


Figure 4. *in vivo* micronucleus assay in the livers of F344 *gpt* delta rats given a diet containing acetamide for 4 weeks. (A) The quantification of ratio MNHEP/HEP (C) and LMNHEP/HEP (B). \*\*: Significantly different from the respective control groups at  $p < 0.01$ , respectively.



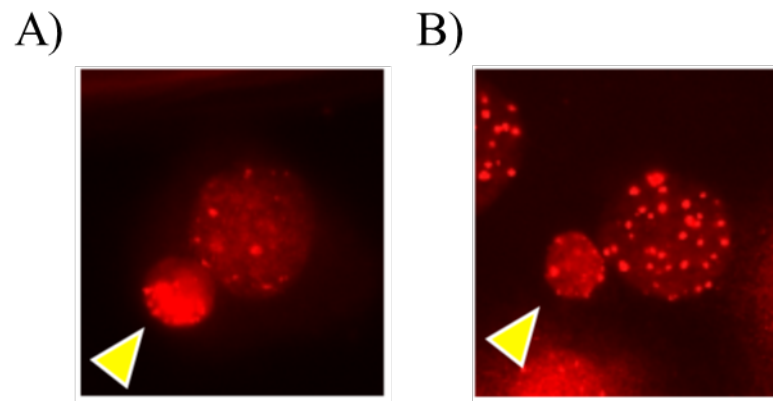


Figure 5. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis with a centromere probe. Representative photos of LMNHEPs induced by acetamide (A) and colchicine (B).

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

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

分担研究課題：肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価

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

研究要旨

本研究では、食品香料化学物質の安全性を *in silico*, *in vitro*, *in vivo* で階層的に評価する評価系を構築することを目的に、*in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物を対象として *in vivo* での遺伝毒性・発がん性を検討する。本分担研究課題では、遺伝毒性が疑われる化合物としてリストアップされた化合物のうち 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質として遺伝毒性・発がん性包括的試験法による *in vivo* での評価を実施した。6週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 0, 30 または 300 mg/kg の用量で 1日1回 13週間強制経口投与し、一般毒性ならびに肝臓を対象とした遺伝毒性・発がん性の検索を実施した。一般毒性検索の結果、3-acetyl-2,5-dimethylfuran は体重、鼻腔、肝臓及び脂質代謝に影響を与える可能性が示唆された。遺伝毒性に関しては、肝臓の *gpt assay* の結果、300 mg/kg/day 投与群における *gpt* 変異体頻度は有意な高値を示したことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran はラット肝臓において変異原性を示すことが明らかとなった。発がん性に関しては、300 mg/kg/day 投与群において肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の数および面積の有意な増加が認められたことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran はラット肝発がん性を有する可能性が示された。本試験法は変異原性が疑われる化合物について *in vivo* における変異原性を検証するための有益なモデルであることが示された。

A. 研究目的

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

価を行うことで、提唱する階層型試験系の開発に寄与することを目指す。

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

明らかにすることを目的とする。今年度は、昨年度までの用量設定試験をもとに、遺伝毒性・発がん性包括的試験法による評価を実施した。

## B. 研究方法

### B-1. 試薬及び動物

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

### B-2. 試験計画

6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラット各群 10 匹にコーン油に混じた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 30 または 300 mg/kg の濃度で 1 日 1 回 13 週間強制経口投与した。対照群にはコーン油を与えた。試験期間中は体重および摂餌量を週 1 回測定し、一般状態の観察を毎日行った。投与終了後、剖検日前日より一晩絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、血液学的検査および血清生化学的検査を実施した。剖検時に全身諸器官・組織を摘出し、脳、肺、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣については重量の測定を行った。前立腺、精嚢、唾液腺 (顎下腺および舌下腺)、下垂体、甲状腺 (上皮小体を含む) に関してはホルマリン固定後に重量の測定を行った。摘出した全身諸器官・組織

については定法に従い病理組織学的検査を実施した。

遺伝毒性評価では肝臓について *gpt assay* による *in vivo* 変異原性の検索を、発がん性評価では肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による検索を実施した。検索対象臓器に関しては、3-acetyl-2,5-dimethylfuran がラット肝発がん性を示すことが知られるフラン環を基本骨格として有していること、および用量設定試験において 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の投与群において肝細胞増殖活性の亢進が認められたことから肝臓を検索対象とした。

いずれの項目についても統計学的解析は Bartlett 検定により分散の均一性を確認し、均一である場合は One-way ANOVA により、均一でない場合は Kruskal-Wallis 検定により群間差を解析した。群間差が認められた項目については、Dunnnett の多重比較検定により各群の有意差を解析した。有意水準は  $p < 0.05$  とした。

#### (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

投与期間中、何れの群においても死亡動物は認められなかった。一般状態の観察において、300 mg/kg/day 投与群の全例で投与 1 週

目から鼻出血が認められたが、症状は投与3週目以降には観察されなかった。

各群の体重および摂餌量の推移を Figure 1 に示す。300 mg/kg/day 投与群において、投与1週目から投与終了時まで統計学的に有意な体重増加抑制が認められた。摂餌量は被験物質投与群において低下する傾向が認められた。

血液学的検査の結果を Table 1 に示す。30 mg/kg/day 以上の投与群の赤血球数、300 mg/kg/day 投与群のヘモグロビン濃度および好酸球比の有意な低値が認められた。また、300 mg/kg/day 投与群の血小板数、好中球比、30 mg/kg/day 投与群の平均赤血球容積および平均赤血球血色素量は有意な高値を示した。

血清生化学的検査の結果を Table 2 に示す。30 mg/kg/day 以上の投与群において、総蛋白、トリグリセリド、総コレステロール、リン脂質、尿素窒素、クレアチニンおよびアラニンアミノトランスフェラーゼの有意な低値、A/G 比の有意な高値が認められた。また、300 mg/kg/day 投与群の総ビリルビンおよびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼは有意な低値を示した。

投与終了後の臓器重量の結果を Table 3 に示す。300 mg/kg/day 投与群の肝臓および腎臓の絶対および相対重量はいずれも有意な高値を示した。300 mg/kg/day 投与群の脳、心臓、胸腺、甲状腺および30 mg/kg/day 以上の投与群の脾臓および唾液腺の絶対重量は有意な低値を示した。一方、300 mg/kg/day 投与群の脳、肺、心臓、副腎、下垂体、精巣、精囊、前立腺の相対重量は有意な高値を示した。また、30 mg/kg/day 投与群において脾臓および唾液腺の相対重量は有意に低下した。

病理組織学的検査の結果を Table 4 に示す。300 mg/kg/day 投与群の肝臓における軽度の小葉中心性肝細胞肥大、鼻腔における嗅上皮の変性/壊死、呼吸上皮化生および鉍質沈着が認められた。

*gpt* assay および *gpt* 変異体スペクトラム

解析の結果をそれぞれ Table 5 および 6 に示す。300 mg/kg/day 投与群における *gpt* 変異体頻度は対照群に比して有意な高値を示した。一方、*gpt* 変異体スペクトラム解析ではいずれの変異パターンにおいても統計学的に有意な変化は認められなかった。

肝前がん病変マーカー GST-P 陽性細胞巢の定量解析の結果を Figure 2 に示す。300 mg/kg/day 投与群における GST-P 陽性細胞巢の数および面積において有意な増加が認められた。

#### D. 考察

一般毒性検索の結果、300 mg/kg/day 投与群において鼻出血（投与2週目まで）、鼻腔嗅上皮の変性、呼吸上皮化生が認められた。昨年度までの用量設定試験の結果、540 mg/kg/day の用量で4週間反復投与したラットにおいても鼻腔嗅上皮の壊死が認められており、3-acetyl-2,5-dimethylfuran は高用量において鼻腔嗅上皮を毒性標的とすることが明らかとなった。

血液学的検査の結果、赤血球数、ヘモグロビン濃度および好酸球比の低値、血小板数、好中球比の高値が認められた。しかし、病理組織学的検査の結果、骨髄や脾臓などの造血器に変化は認められず、出血もみられなかったことから、毒性学的に意義の乏しい変化であると考えた。

血清生化学的検査の結果、血清中のトリグリセリド、総コレステロール、リン脂質は用量依存的に低下したことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran は生体の脂質代謝に影響を与える可能性が考えられた。一方、その他の項目において統計学的に有意な変化が認められたものの、変化の程度は小さく、関連する病理組織学的な変化も見られないことから、毒性学的な意義は乏しいと考えられた。

臓器重量においては肝臓および腎臓の絶対および相対重量の有意な高値が認められた。肝臓では病理組織学的に小葉中心性肝細胞肥大が認められていることから、この

変化の反映した投与に起因した変化であると考えられた。一方、腎臓については関連する病理組織学変化がないことから毒性学的意義の乏しい変化であると考えた。その他、脳、肺、心臓、副腎、下垂体、精巣、精嚢、前立腺の相対重量の増加が認められたが、これら変化は絶対重量の増加を伴っていないことから、体重の低値に起因した変化であると考えた。

遺伝毒性に関して、既知類似化合物に関する情報に加え、用量設定試験の結果から化合物の影響が見られる臓器として選別した肝臓について *gpt* assay を行った。その結果、300 mg/kg/day 投与群における *gpt* 変異体頻度は有意な高値を示したことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran はラット肝臓において変異原性を示すことが明らかとなった。さらに、300 mg/kg/day 投与群では GST-P 陽性細胞巢の有意な増加が認められたことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran は肝発がん性を有する可能性も示された。

被験物質の 3-acetyl-2,5-dimethylfuran は、先行する本間、安井らの *in silico* および *in vitro* 解析結果から変異原性が疑われた化合物の一つである。今回、*gpt delta* ラット用いた遺伝毒性・発がん性包括的試験法を用いることで本剤の *in vivo* における変異原性および発がん性を検証することができた。本試験法は変異原性が疑われる化合物について *in vivo* における変異原性を検証するための有益なモデルであることが示された。

#### E. 結論

*In silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran について *in vivo* での検討を行った。3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 13 週間反復投与した結果、肝臓における *gpt* 変異体頻度は有意な高値を示したことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran はラット肝臓において変異原性を示すことが明らかとなった。さらに、GST-P 陽性細胞巢の有意な増加が認められたことから、

3-acetyl-2,5-dimethylfuran は肝発がん性を有する可能性が示された。本試験法は変異原性が疑われる化合物について *in vivo* における変異原性を検証するための有益なモデルであることが示された。

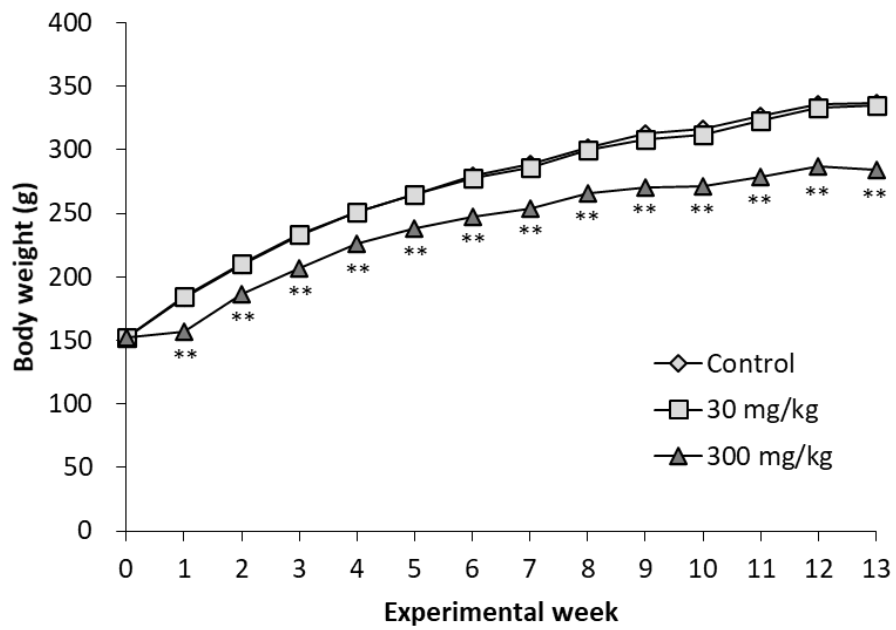
F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究成果  
G-1. 発表論文  
なし

G-2. 学会発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

A



B

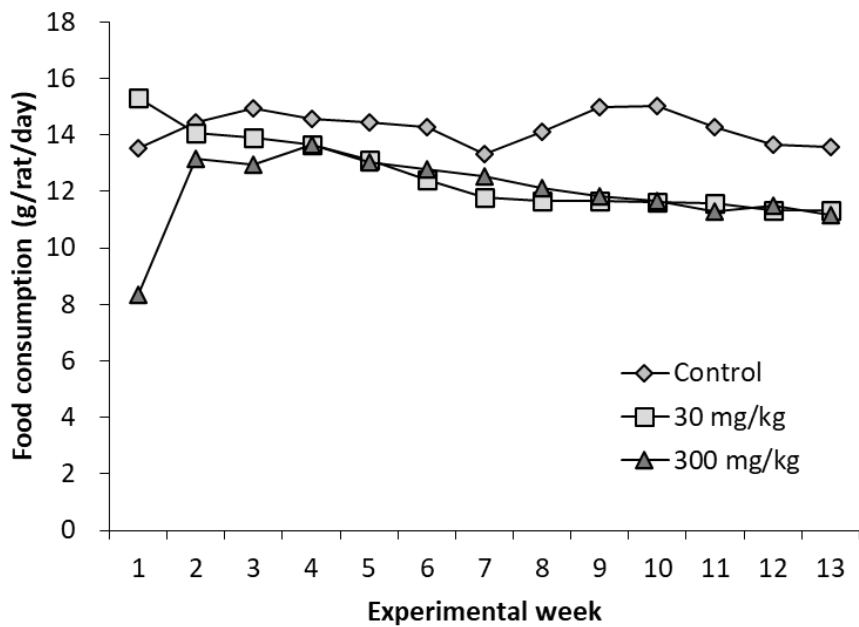


Figure 1. Body weight (A) and food consumption of F344 *gpt* delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks. \*\*  $p < 0.01$  vs control.

Table 1. Hematological data for F344 *gpt* delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks.

		Control	30 mg/kg	300 mg/kg
Number of animals		10	10	10
RBC	(10 <sup>6</sup> /mL)	9.25 ± 0.12 <sup>a</sup>	8.99 ± 0.22 *	8.96 ± 0.24 **
HGB	(g/dL)	15.5 ± 0.2	15.3 ± 0.4	15.1 ± 0.4 *
HCT	(%)	45.6 ± 0.6	45.3 ± 1.2	44.6 ± 1.5
MCV	(fL)	49.3 ± 0.6	50.4 ± 0.4 **	49.8 ± 0.5
MCH	(pg)	16.7 ± 0.1	17.0 ± 0.2 **	16.8 ± 0.2
MCHC	(g/dL)	33.9 ± 0.2	33.7 ± 0.3	33.7 ± 0.2
PLT	(10 <sup>3</sup> /mL)	647.7 ± 63.4	665.6 ± 36.2	735.1 ± 57.2 **
WBC	(10 <sup>3</sup> /mL)	4.13 ± 0.67	4.02 ± 0.85	3.46 ± 0.96
Differential cell counts				
Neutrophils	(%)	22.7 ± 7.4	27.6 ± 8.0	30.9 ± 6.8 *
Eosinophils	(%)	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2 **
Basophils	(%)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2
Lymphocytes	(%)	69.7 ± 7.2	68.9 ± 8.0	66.1 ± 6.6
Monocytes	(%)	2.4 ± 0.6	2.2 ± 0.4	2.0 ± 0.4

<sup>a</sup> Data represent means ± SD.

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

Table 2. Serum biochemistry data for F344 *gpt* delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks.

		Control	30 mg/kg	300 mg/kg
TP	(g/dL)	6.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.3 ± 0.2 **	6.3 ± 0.2 **
A/G		2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.1 *	2.6 ± 0.2 **
Alb	(g/dL)	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.6 ± 0.1
T-Bil	(mg/dL)	0.046 ± 0.008	0.041 ± 0.007	0.035 ± 0.008 *
Glu	(mg/dL)	168 ± 26	157 ± 19	164 ± 28
TG	(mg/dL)	128 ± 28	73 ± 24 **	33 ± 5 **
T-Cho	(mg/dL)	71 ± 5	63 ± 7 **	61 ± 3 **
PL	(mg/dL)	125 ± 9	108 ± 12 **	102 ± 4 **
BUN	(mg/dL)	16.1 ± 1.1	13.2 ± 1.4 **	12.1 ± 0.6 **
CRN	(mg/dL)	0.32 ± 0.01	0.30 ± 0.01 **	0.23 ± 0.02 **
Ca	(mg/dL)	10.5 ± 0.2	10.5 ± 0.2	10.4 ± 0.2
P	(mg/dL)	5.7 ± 0.2	5.5 ± 0.5	5.9 ± 0.3
Na	(mEq/dL)	143.7 ± 1.1	143.5 ± 0.8	143.7 ± 1.6
K	(mEq/dL)	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.2
Cl	(mEq/dL)	103.1 ± 1.0	102.8 ± 1.0	102.8 ± 1.1
AST	(IU/L)	84 ± 31	67 ± 8	57 ± 7 **
ALT	(IU/L)	59 ± 20	45 ± 6 *	36 ± 3 **
ALP	(IU/L)	461 ± 39	466 ± 50	425 ± 32
γ-GTP	(IU/L)	<3	<3	<3

<sup>a</sup> Data represent means ± SD.

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



Table 3. Organ weight data for F344 gpt delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks.

	Control	30 mg/kg	300 mg/kg
Number of animals	10	10	10
Final body weights (g)	329 ± 16 <sup>a</sup>	328 ± 14	278 ± 11 **
Organ weights (absolute) (g)			
Brain	1.97 ± 0.04	1.94 ± 0.04	1.82 ± 0.04 **
Lungs	0.98 ± 0.06	1.02 ± 0.07	0.92 ± 0.06
Heart	0.87 ± 0.03	0.88 ± 0.05	0.80 ± 0.05 **
Thymus	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.15 ± 0.03 **
Liver	8.51 ± 0.60	8.50 ± 0.64	9.40 ± 0.49 **
Kidneys	1.94 ± 0.11	2.00 ± 0.11	2.13 ± 0.09 **
Spleen	0.63 ± 0.02	0.60 ± 0.04 *	0.53 ± 0.01 **
Adrenals	0.044 ± 0.007	0.042 ± 0.004	0.044 ± 0.006
Pituitary	0.0104 ± 0.0009	0.0101 ± 0.0008	0.0109 ± 0.0009
Thyroid	0.0211 ± 0.0029	0.0212 ± 0.0031	0.0181 ± 0.0016 *
Testes	2.91 ± 0.05	2.87 ± 0.11	2.88 ± 0.11
Seminal vesicle	1.21 ± 0.18	1.16 ± 0.15	1.31 ± 0.09
Prostate	0.93 ± 0.15	0.86 ± 0.10	0.92 ± 0.15
Salivary gland	0.62 ± 0.06	0.55 ± 0.03 **	0.48 ± 0.04 **
Organ weights (relative) (g/100g b.w.)			
Brain	0.60 ± 0.03	0.59 ± 0.02	0.65 ± 0.02 *
Lungs	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.33 ± 0.02 **
Heart	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.02 *
Thymus	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Liver	2.59 ± 0.08	2.59 ± 0.10	3.38 ± 0.10 **
Kidneys	0.59 ± 0.01	0.61 ± 0.02	0.77 ± 0.02 **
Spleen	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01 *	0.19 ± 0.01
Adrenals	0.013 ± 0.002	0.013 ± 0.001	0.016 ± 0.002 *
Pituitary	0.0032 ± 0.0002	0.0031 ± 0.0002	0.0039 ± 0.0003 **
Thyroid	0.0064 ± 0.0008	0.0064 ± 0.0009	0.0065 ± 0.0006
Testes	0.89 ± 0.04	0.88 ± 0.03	1.04 ± 0.06 **
Seminal vesicle	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.05	0.47 ± 0.03 **
Prostate	0.28 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.33 ± 0.06 *
Salivary gland	0.188 ± 0.017	0.166 ± 0.010 **	0.173 ± 0.017

<sup>a</sup> Data represent means ± SD.

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

Table 4. Histopathological findings of F344 gpt delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks.

	Control	30 mg/kg	300 mg/kg
Number of animals	10	10	10
Liver			
Hypertrophy, hepatocellular, centrilobular, slight	0	0	5 *
Kidney			
Lymphoid infiltration, minimal	1	0	0
Heart			
Myocardial degeneration / mononuclear cell infiltration, minimal	1	-	0
Pituitary			
Cyst, pars distalis	1	-	0
Nasal cavity			
Degeneration/necrosis, olfactory epithelium, slight	0	0	6 *
Respiratory metaplasia	0	0	10 *
Mineralization	0	0	4 *

\*, Significantly different from the control at  $p < 0.05$  (Fisher's exact test)

Table 5. *gpt* mutant frequencies in the liver of F344 *gpt* delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks.

	Animal No.	Cm <sup>R</sup> clones (x 10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant Frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± S.D.
Control	2	4.5	4	0.90	0.78 ± 0.28 <sup>a</sup>
	3	12.0	10	0.84	
	5	5.7	4	0.70	
	8	3.7	4	1.09	
	9	5.7	2	0.35	
30 mg/kg	13	3.2	2	0.63	0.49 ± 0.31
	14	3.9	1	0.26	
	15	3.7	1	0.27	
	18	10.3	10	0.97	
	20	3.3	1	0.30	
300 mg/kg	21	1.9	5	2.58	1.95 ± 1.15 *
	22	8.1	3	0.37	
	23	2.5	7	2.78	
	27	2.4	7	2.94	
	30	2.8	3	1.08	

<sup>a</sup> Data represent means ± SD.

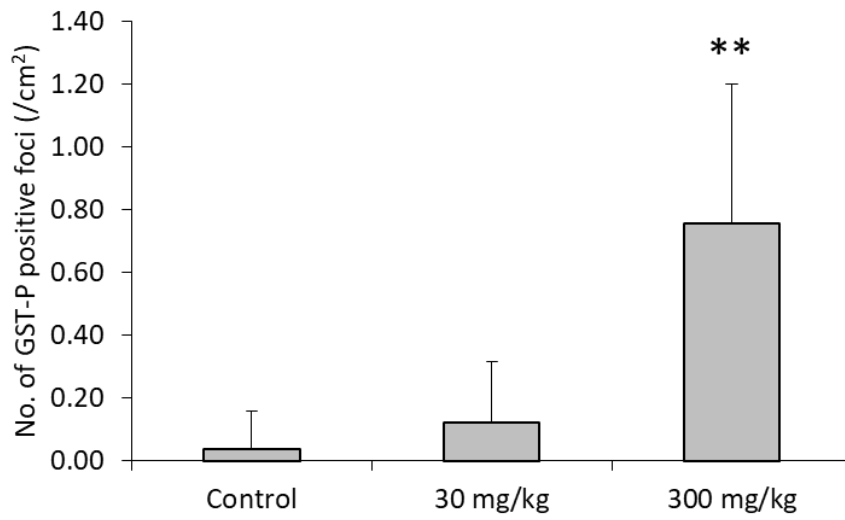
\*: Values are significantly different from control at  $p < 0.05$ .

Table 6. Mutation spectra of *gpt* mutants in the liver of F344 *gpt* delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks.

	Control		30 mg/kg		300 mg/kg	
	No. (%)	MF (x10 <sup>-5</sup> )	No. (%)	MF (x10 <sup>-5</sup> )	No. (%)	MF (x10 <sup>-5</sup> )
Base substitution						
Transversion						
G:C-T:A	1 (4.2)	0.02 ± 0.04 <sup>a</sup>	3 (20.0)	0.13 ± 0.15	2 (8.0)	0.16 ± 0.22
G:C-C:G	1 (4.2)	0.02 ± 0.04	2 (13.3)	0.08 ± 0.13	3 (12.0)	0.27 ± 0.25
A:T-T:A	1 (4.2)	0.04 ± 0.10	0 (0.0)	0	2 (8.0)	0.16 ± 0.22
A:T-C:G	0 (0.0)	0	1 (6.7)	0.06 ± 0.14	1 (4.0)	0.07 ± 0.16
Transition						
G:C-A:T	16 (66.7)	0.47 ± 0.14	4 (26.7)	0.08 ± 0.17	10 (40.0)	0.77 ± 0.80
A:T-G:C	2 (8.3)	0.10 ± 0.14	2 (13.3)	0.07 ± 0.12	4 (16.0)	0.27 ± 0.34
Deletion						
Single bp	1 (4.2)	0.04 ± 0.08	0 (0.0)	0	1 (4.0)	0.08 ± 0.19
Over 2 bp	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	2 (8.0)	0.16 ± 0.35
Insertion	1 (4.2)	0.05 ± 0.12	3 (20.0)	0.06 ± 0.13	0 (0.0)	0
Complex	1 (4.2)	0.04 ± 0.08	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0
Total	24	0.78 ± 0.28	15	0.49 ± 0.31	25	1.95 ± 1.15

<sup>a</sup> Data represent means ± SD.

A



B

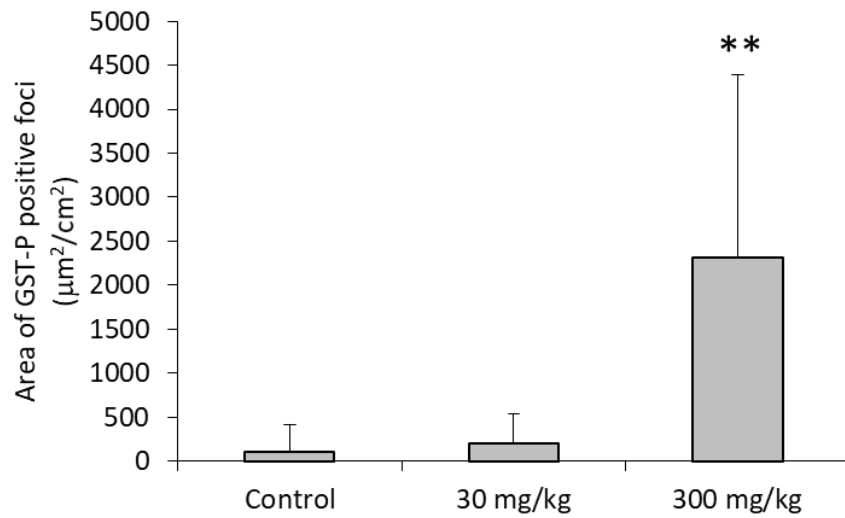


Figure 2. Number (A) and area (B) of GST-P positive foci in the liver of F344 *gpt* delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks. Data represent means  $\pm$  SD. \*\* $p$ <0.01 vs control.

## オルガノイドの調製、オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備

研究分担者 今井俊夫 国立がん研究センター・研究所・動物実験部門長

## 研究要旨

本分担研究課題においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的として、バリデーション試験において使用する陽性および陰性対照物質の選択と発がん感受性に対するオルガノイド樹立に使用するマウス系統差を明らかにするための解析を行っている。今年度は、C57BL (B6) 背景の野生型、*Trp53* ヘテロノックアウト (*Trp53* +/-) および *Trp53* ホモノックアウト (*Trp53* -/-) マウスを用いて肺および肝臓 (胆管) 由来のオルガノイドを調製し、陽性対照物質の遺伝毒性発がん物質としてはメチルニトロソ尿素 (MNU)、被験物質として遺伝毒性発がん物質とされるアセトアミドの発がん作用を検討した。結果として、高感受性を期待した *Trp53* -/- マウス由来オルガノイドではMNU、アセトアミドともに明らかな影響を示さなかったが、野生型および *Trp53* +/- マウス由来の特に肝臓 (胆管) オルガノイドをヌードマウス皮下に移植した結果、発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性 (一部微小がんを含む) が、各処置群の1用量あるいは2用量において3/4~4/4の頻度でみられた。以上より、B6背景の野生型および *Trp53* +/- マウスの肝臓 (胆管) 由来オルガノイドは遺伝毒性・非遺伝毒性発がん物質のMNUとアセトアミドの *in vitro* 処置に対して発がん感受性を示し、香料等の発がん性評価に有用であることが示された。

## A. 研究目的

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

具体的には、平成30年度にBALB/c背景およびB6背景の *Trp53* +/- および野生型マウス由来の肺および肝臓 (胆管) 由来オルガノイドを用いて3つの遺伝毒性発がん物質を用いる解析を行った結果、顕著な系統差がみられなかったことから、マウス背景系統としてはB6マウスとし、マウス個体での *in vivo* 発がん実験では遺伝毒性発がん物質に高感受性を示すが短期間でリンパ腫が発生し他臓器における発がん性が検出しづらい *Trp53* -/- マウスを加えることとした。また、遺伝毒性発がん物質としては *in vivo* 発がん実験では肺を含む多臓器で発がん性を示すメチルニトロソ尿素 (MNU) を、被験物質としては食品中に含まれラットの長期発がん性試験で肝臓に発がん性を示すアセトアミドを *in vitro* で処置した。各化学物質の発がん性評価は、オルガノイドをヌードマウス皮下に接種後8週間経過後に採取した組織の病理組織学的解析により行った。

## B. 研究方法

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

## 1) オルガノイドの調製

国立がん研究センター研究所にて繁殖・維持しているB6背景の *Trp53*<sup>-/-</sup>、*Trp53*<sup>+/-</sup> および野生型の雄マウス（5週齢）の肺および肝臓からオルガノイドを調製した。調製手順の概略は次の通りである。

### [1日目]

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

### [2日目]

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

### [1週間目（オルガノイドの増殖程度で時期を判断）]

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

## 2) オルガノイドへの化学物質暴露

### i) 被験物質濃度：

メチルニトロソ尿素（MNU）；1) で調製し 96ウェルプレートに播種した B6 背景の *Trp53*<sup>-/-</sup>；*Trp53*<sup>+/-</sup>；野生型マウス由来の肺および肝臓（胆管）オルガノイドに対して 0、0.125～4.0 mM（+S9 mix 添加なし；発がんに代謝活性化を要さないため）濃度にて MNU を 24 時間暴露した後、RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay（プロメガ）により生細胞数を測定した。MNU 処置直後と 72 時間後までの生細胞数から、本実験では、肺オルガノイドについては各系統とも 0、0.125、0.5 mM、肝臓（胆管）オルガノイドについては *Trp53*<sup>-/-</sup>；*Trp53*<sup>+/-</sup>；野生型マウスについて各々 0、0.125、0.5 mM；0、0.25、1.0 mM；0、0.5、2.0 mM（+S9 mix 添加なし）濃度で行うこととした。

アセトアミド；MNU と同様に予備検討を行い、2.0、4.0 mM 濃度においても生細胞数に影響がみられなかったことから、本実験は 0、0.5、2.0 mM（+S9 mix 添加あり）濃度で行うこととした。

### ii) 被験物質処置：

肺および肝臓（胆管）オルガノイドは12ウェルプレートで培養し、約1週間毎の継代の際、1日目の播種後に培地に被験物質を添加、24時間暴露後の2日目にPBSで洗浄後マトリゲルを重層し培養を継続した。被験物質処置は連続3回の継代時に行った。

## 4) オルガノイドのヌードマウス皮下への接種

[オルガノイドの継代・培養を3回程度繰返し後]

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

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

### 1) パラフィン包埋切片の作製と病理組織学的評価

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

### (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### (1) メチルニトロソ尿素（MNU）

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下における *Trp53*<sup>-/-</sup>、*Trp53*<sup>+/-</sup> および野生型マウス由来の肺オルガノイドについて、MNU処置群と非処置群ともに長径2.7～9.0 mm程度の白色～乳白色透明の結節としてみられ、MNU処置による明らかな違いは認められなかった。肝臓（胆管）オルガノイドについても、MNU処置群と非処置群ともに長径2.9～9.8 mm程度の白色～乳白色透明の結節（一部赤褐色出血痕または透明嚢胞を含む）としてみられ、MNU処置による明らかな違いは認められなかった。

#### 2) 病理組織学的所見

*Trp53*<sup>+/-</sup> および野生型マウス由来の肝臓（胆管）

オルガノイドのMNU低濃度および高濃度処置群各3/4あるいは4/4部位において、発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性/異形成（高濃度群1/4部位では微小がん）がみられた（写真1）。*Trp53*<sup>-/-</sup>マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドでは、MNU低濃度および高濃度処置群各1/4部位に同様の所見（低濃度処置群1/4部位では微小がん）がみられたが有意ではなかった。肺オルガノイドについては、各系統由来ともにMNU処置による影響はみられなかった。

（表1）

## （2）アセトアミド

### 1）肉眼所見

ヌードマウス皮下における*Trp53*<sup>-/-</sup>、*Trp53*<sup>+/-</sup>および野生型マウス由来の肺オルガノイドについて、アセトアミド処置群と非処置群ともに長径2.7~9.0 mm程度の無色透明~白色~乳白色透明の結節としてみられた。肝臓（胆管）オルガノイドについても、アセトアミド処置群と非処置群ともに長径2.5~16.3 mm程度の結節がみられたが、明らかなアセトアミドの影響は認められなかった。

### 2）病理組織学的所見

*Trp53*<sup>-/-</sup>マウス由来の肺オルガノイドには、アセトアミド高濃度処置群の2/4部位に浸潤性増殖がみられたが、有意ではなかった（写真2）。*Trp53*<sup>+/-</sup>マウスと野生型マウス由来の肺オルガノイドにはアセトアミド処置による影響はみられなかった。野生型マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドのアセトアミド低濃度および高濃度処置群各3/4部位および4/4部位において、上皮細胞の重層化と浸潤性増殖がみられ、発がん性を示唆する所見と考えられた。*Trp53*<sup>+/-</sup>マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドのアセトアミド高濃度処置群においても2/4部位の微小がん、2/4部位には浸潤性がみられた（写真3）。*Trp53*<sup>-/-</sup>マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドには、明らかなアセトアミド処置による影響はなかった。（表1）

以上、B6背景の*Trp53*<sup>+/-</sup>マウスと野生型マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドは遺伝毒性発がん物質のMNUあるいは非遺伝毒性発がん物質とされるアセトアミドの*in vitro* 処置に対して発がん感受性を示した。一方、*Trp53*<sup>-/-</sup>マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドはMNUに対し軽微な感受性を示したものの有意ではなく、アセトアミドには非感受性であった。また、B6背景の*Trp53*<sup>-/-</sup>マウス由来の肺オルガノイドはアセトアミドに対して軽微な感受性を示したものの有意ではなく、*Trp53*<sup>+/-</sup>マウスと野生型マウス由来の肺オルガノイドは非感受性であった。更に、何れの系統マウス由来の肺オルガノイドにおいてもMNUには非感受性であった。

肺における化学発がんに関し、B6マウスは感受性であることが示されているが（Kakehashi A et al., *Int J Mol Sci* 18, 2017）、一方でB6背景の*Trp53*<sup>-/-</sup>

*+*および*Trp53*<sup>+/-</sup>マウスに対するMNUの発がん性はリンパ腫および皮下などの肉腫などとする報告もあり（Ohgagi H et al., *Mol Carcinog* 28, 2000）、広範囲の化学物質に感受性を示すマウス系統については引続き検討を要すると考えられた。

## D. 健康危険情報

特になし。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Matsuura, T., Maru, Y., Izumiya, M., Hoshi, D., Kato, S., Ochiai, M., Hori, M., Yamamoto, S., Tasuno, K., Imai, T., Aburatani, H., Nakajima, A., Hippo, Y.: Organoid-based *ex vivo* reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 41, 490-501 (2020)
- (2) Naruse, M., Masui, R., Ochiai, M., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T. An organoid-based carcinogenesis model induced by *in vitro* chemical treatment. *Carcinogenesis* 41, 1444-1453 (2020)
- (3) Naruse, M., Ochiai, M., Sekine, S., Taniguchi, H., Yoshida, T., Ichikawa, H., Sakamoto, H., Kubo, T., Matsumoto, K., Ochiai, A., Imai, T. Re-expression of *REG* family and *DUOXs* genes in CRC organoids by co-culturing with CAFs. *Sci. Rep.* 11:2077 (2021)
- (4) Yagishita, S., Kato, K., Takahashi, M., Imai, T., Yatabe, Y., Kuwata, T., Suzuki, M., Ochiai, A., Ohtsu, A., Shimada, K., Nishida, T., Hamada, A., Mano, H. Characterization of the large-scale Japanese patient-derived xenograft (J-PDX) library. *Cancer Sci.* (In press)

### 2. 学会発表

- (1) 今井俊夫、町田雪乃、成瀬美衣：マウス正常乳腺組織由来オルガノイドの特性. 第37回日本毒性病理学会学術総会（浜松（オンライン））：2021年1月

## F. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

### 1. 特許取得

該当なし。

### 2. 実用新案登録

該当なし。

### 3. その他

該当なし。

(表1)

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

年度	マウス系統	遺伝子型	臓器	被験物質							
				アセトアミド			N-メチル-N-ニトロソ尿素				
				対照	低濃度	高濃度	対照	低濃度	高濃度		
R2	B6	野生型	肺	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		
		<i>Trp53</i> <sup>+/-</sup>		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4		
		<i>Trp53</i> <sup>-/-</sup>		0/4	0/4	2/4	0/4	0/4	0/4		
		野生型	肝 (肝内胆管)	0/4	3/4	4/4	1/4	3/4	4/4		
		<i>Trp53</i> <sup>+/-</sup>		1/4	0/4	4/4**	0/4	4/4	4/4*		
		<i>Trp53</i> <sup>-/-</sup>		0/4	0/4	0/4	0/4	1/4*	1/4		

\* 1/4造腫瘍性を含む      \*\* 2/4造腫瘍性を含む

:  $p=0.0025$

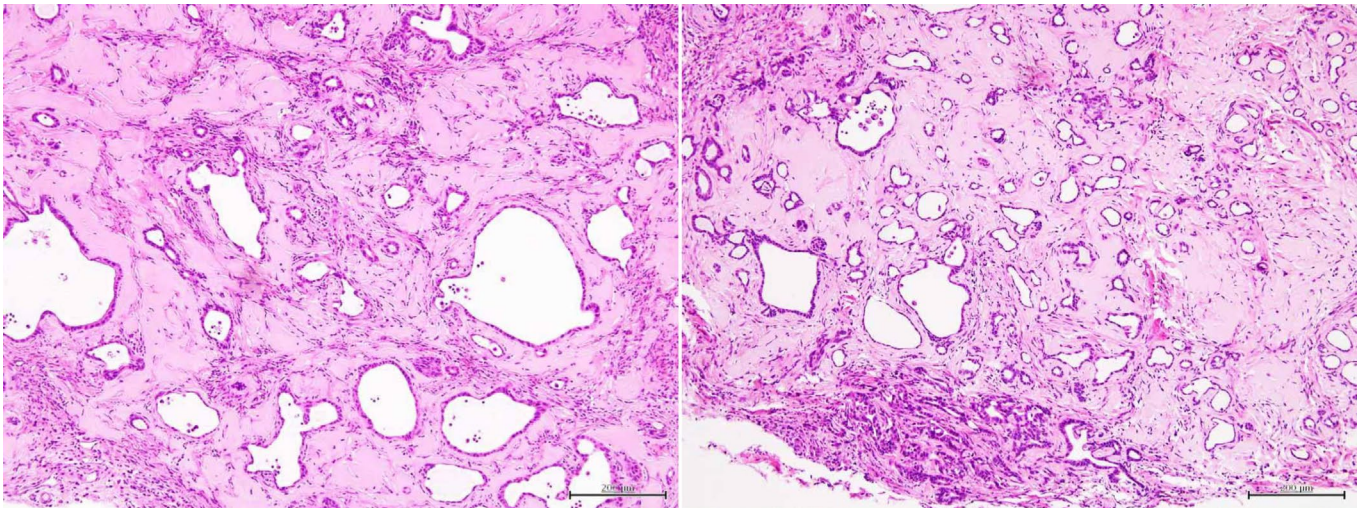
:  $p=0.012$

:  $p=0.018$

:  $p=0.072$

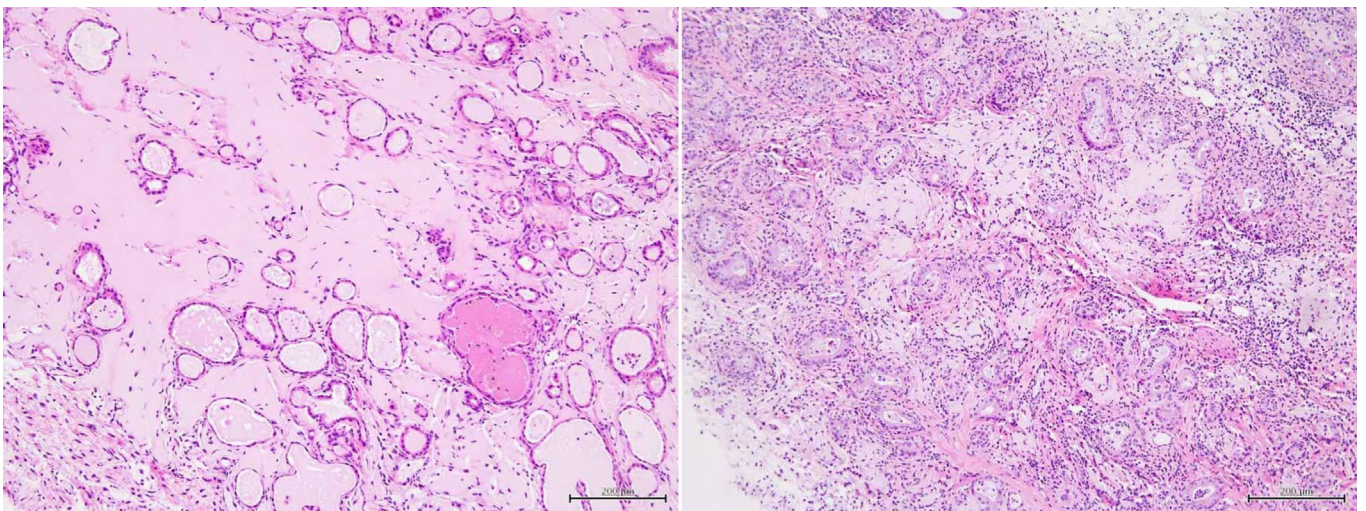
:  $p=0.091$  (mxn分割表)



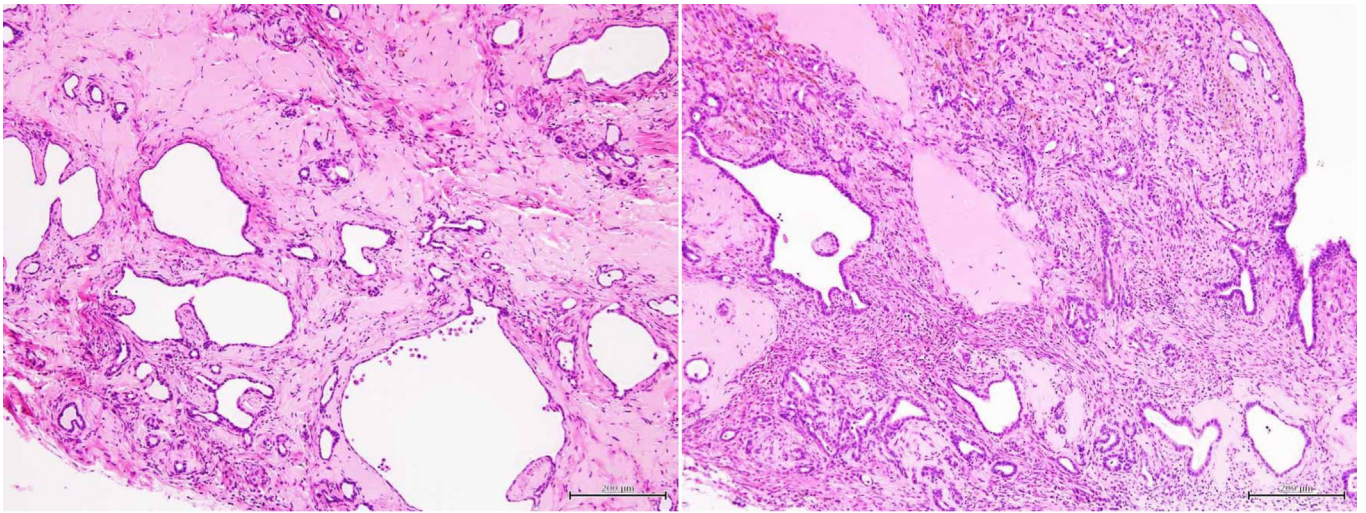


(写真1) MNU処置した *Trp53* +/-マウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。

対照群(左)では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。MNU高濃度群(右)では写真下方に微小がんが、左上方には浸潤性を示す腺管が認められる。



(写真2) アセトアミド処置した *Trp53* -/-マウス由来の肺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。対照群(左)では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。アセトアミド高濃度群(右)では上皮細胞が立方上皮化し、さらに周囲組織に浸潤し炎症細胞が反応している像がみられる。



(写真3) アセトアミド処置した *Trp53* +/- マウス由来の肝臓 (胆管) オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。対照群 (左) では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。アセトアミド高濃度群 (右) では写真上方に隆起性の微小がんがみられる。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

## オルガノイドの調製

研究分担者 落合 雅子 静岡県立大学 食品栄養環境科学研究所 客員共同研究員

## 研究要旨

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究において、レポーター遺伝子導入マウスから3次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質を検出し、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウスあるいはshRNAにより発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系を用いることで腫瘍様組織あるいは増殖活性・異型性・浸潤性を指標として既知の発がん性物質を検出する方法を確立する。本分担研究においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的としている。令和2年度は、B6背景 *Trp53* ヘテロノックアウトおよび野生型マウスについては肺および肝臓（胆管）オルガノイドを新たに調製し、分担研究者へ調整済みオルガノイドを送付した。調整済みオルガノイドの送付は、12ウェルプレートでの常温輸送もしくは凍結保存したチューブの冷凍状態（-80℃）での輸送で行った。また、肺や肝臓（胆管）オルガノイドを中心に進めてきた化学物質の評価について、更に大腸を標的としたケースに対応するために、B6マウスの大腸由来オルガノイドの調製を検討した。

## A. 研究目的

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究において、レポーター遺伝子導入マウスから3次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質を検出し、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウスあるいはshRNAにより発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系を用いることで既知の発がん物質が腫瘍様組織あるいは増殖活性・異型性・浸潤性を指標とする発がん性物質を検出する方法を確立する。本分担研究においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的としている。今年度は、C57BL/6(B6)背景 *Trp53* ヘテロノックアウトおよび野生型マウスの肺および肝臓（胆管）オルガノイドの調製を行い、分担研究者に供給した。また、肺や肝臓（胆管）オルガノイドを中心に進めてきた化学物質の評価について、更に大腸を標的としたケースに対応するために、大腸由来オルガノイドの調製の検討を行った。

## B. 研究方法

B6背景 *Trp53* ヘテロノックアウトおよび野生型マウスは、自家繁殖した雄各2匹を5週齢時に使用した。

安楽死後に、肺と肝臓を摘出し、以下の手順に従ってオルガノイドを調製した。

肺の肺門部、肝臓の肝門部を除いて細切し、PBS(-)中で強く攪拌した後に遠心した。DispaseII (Roche)、Collagenase P (Roche) を含む酵素液で37℃、30分間処置した後、ピペッティングにて細胞を分散させ、Cell strainerを通して、12ウェルプレートを用いてMatrigel (Corning) 上に播種し、BSAのほか、EGF (Peprotech)、Noggin (Peprotech)、Y27632 (和光純薬)、Jagged-1 (AnaSpec) など増殖因子を含む培地で37℃、5%CO<sub>2</sub>下にて1日間培養、Matrigelを重層化して更に培養した。1週間に1回程度継代しつつオルガノイドを増やした。継代方法については「マウス正常組織由来オルガノイドの培養手順書」として平成30年度に纏めたSOPの記載に従って進めた。増やしたオルガノイドの一部は、保存液（ラボバンカー2-無血清タイプ、十慈フィールド）を用いて凍結保存した。

増やしたオルガノイドを他の分担研究者へ送付する際には、12ウェルプレートとして常温輸送、または凍結保存したチューブの冷凍状態（-80℃）での輸送として、宅配便で送付した。

大腸オルガノイドの調製は、B6マウス（雄、4週齢）各2匹を日本チャールス・リバー社より購入した。1週間の順化期間後に安楽死させ、大腸を摘出し、肺、肝臓（胆管）と同様の手順に従い、Matrigel上に播種し

た。培地の組成は、Wang Fらの論文(Gastroenterology, 145:383-95, 2013)の方法を改変し、最終的には、EGF, A 83-01(FCS), BSAを含む培地で培養した。継代方法は、上記のSOPの記載(Accumaxの代わりにAccutaseを使用)に従って進めた。

### C. 研究結果と考察

B6背景 *Trp53* ホモノックアウト、ヘテロノックアウトおよび野生型マウス各2匹から肺および肝臓(胆管)オルガノイドは何れも3~5回程度継代すると12ウェル程度に増やすことができたが(写真1)、他の分担研究者へ送付する目的で、更に継代を続けてオルガノイドを増やした。増やしたオルガノイドの一部は、保存液を用いて凍結保存した。

増やしたオルガノイドの他施設への輸送に際しては、12ウェルプレートで培養中の状態から培地のみを除き、重層したマトリゲル中で維持したまま宅配便により送付する、常温条件での輸送と、オルガノイドを凍結保存したチューブを-80℃(ドライアイス)の冷凍状態で宅配便により送付する方法を採用した。季節を問わず施設間の輸送を可能にするためには、庫内を37℃程度に維持できる輸送箱による方法も検討する必要があると考えられた。

B6マウス由来大腸オルガノイドの調製においては、2匹中1匹の検体で、10回の継代時に、12ウェル程度に増やすことができている(写真2、実験継続中)。しかし、安定的に供給するには、更に効率的にオルガノイドを増やす必要があり、培地条件等の検討が必要であると考えられる。

(倫理面への配慮)

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

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Matsuura, T., Maru, Y., Izumiya, M., Hoshi, D., Kato, S., Ochiai, M., Hori, M., Yamamoto, S., Tasuno, K., Imai, T., Aburatani, H., Nakajima, A., Hippo, Y.: Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 41(4), 490-501 (2020)
- (2) Naruse, M., Masui, R., Ochiai, M., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T. An organoid-based carcinogenesis model induced by *in vitro* chemical treatment. *Carcinogenesis* 41(10), 1444-1453 (2020)
- (3) Naruse, M., Ochiai, M., Sekine, S., Taniguchi, H., Yoshida, T., Ichikawa, H., Sakamoto, H., Kubo, T., Matsumoto, K., Ochiai, A., Imai, T. Re-expression of *REG* family and *DUOXs* genes in CRC organoids by co-culturing with CAFs. *Sci Rep* 11(1), 2077 (2021)

#### 2. 学会発表

- (1) 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆかり：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79回日本癌学会学術総会(2020年10月、広島)
- (2) 成瀬美衣、落合雅子、落合淳志、今井俊夫：大腸がんオルガノイドとCAFの共培養によりREG familyやdual oxidase genesの遺伝子発現が誘導される。第79回日本癌学会学術総会(2020年10月、広島)

### E. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。) ㍵

#### 1. 特許取得

なし

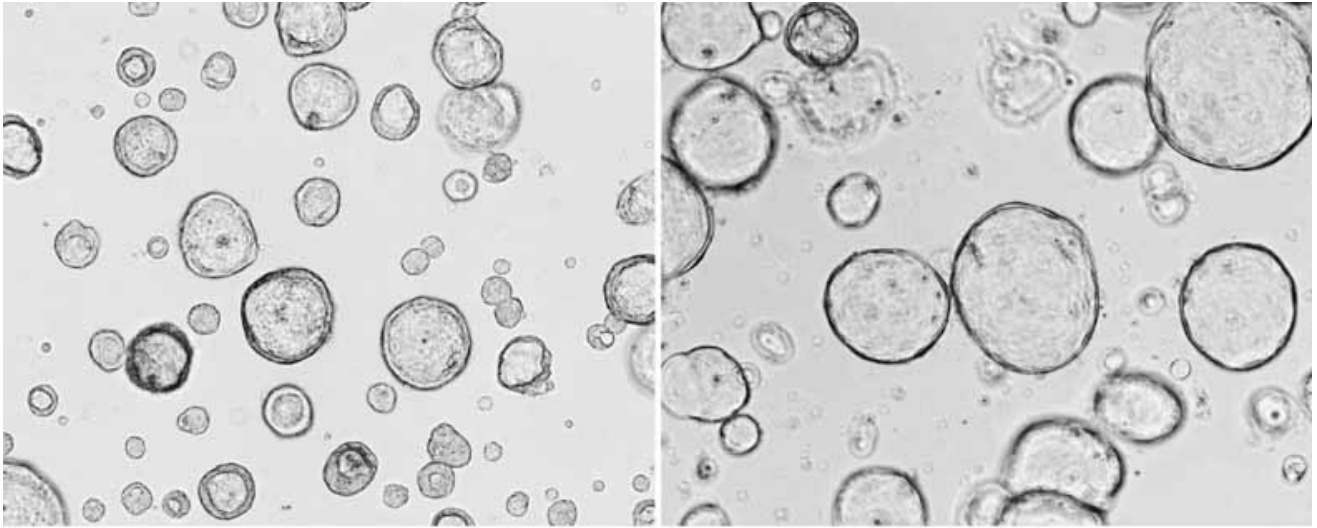
#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

(写真1) B6背景 *Trp53* ホモノックアウトマウス由来の肺 (左) および肝臓 (胆管) (右) オルガノイド



## オルガノイド遺伝毒性解析実験に関する研究

研究分担者 戸塚ゆ加里 国立がん研究センター研究所 がんモデル開発部門 ユニット長

## 研究要旨

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

## A. 研究目的

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

## B. 研究方法

① *gpt* 遺伝子を指標とした変異原性試験

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

② 上記試験における変異スペクトルの解析および既報の*in vivo*試験結果との比較

①で得られた変異コロニーのシーケンス解析を行い、変異スペクトルを算出した。これらのデータとすでに報告のある*in vivo*実験の結果を照合し、当試験の妥当性の検討を行った。

## C. 研究結果

① *gpt* 遺伝子を指標とした変異原性試験

肺オルガノイドから抽出したゲノムDNAを用い、インビトロパッケージング法により標的遺伝子をプラスミドとして回収し、*gpt*変異解析用の試験菌株に感染させて変異頻度の解析を行った。その結果、AA曝露によって変異頻度は0 mMと比べて0.28 mM (n=3)では差がなかったが、1.4 mM (n=3)で約4倍と増加傾向が見られた（図1）。

② 上記試験における変異スペクトルの解析および既報の*in vivo*試験結果との比較

①の変異原性試験で得られた変異コロニーの変異スペクトルの解析を行ったところ、変異頻度と同様にコントロールと0.28 mM曝露群に差は見られなかったが、1.4 mM曝露群においては、AT > TA、AT > CG、Insertion及びDeletionの有意な増加が認められた（図2）。

これらの変異スペクトルデータと既報（Y. Ishii *et al.* *Mutagenesis*, 2015,30,227-235）の*in vivo*試験結果と比較したところ、一部で同様の傾向を示した。

図1 肺オルガノイドを用いたAAの遺伝子変異原性試験

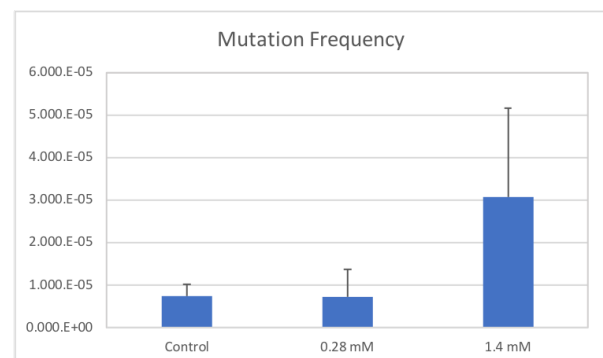
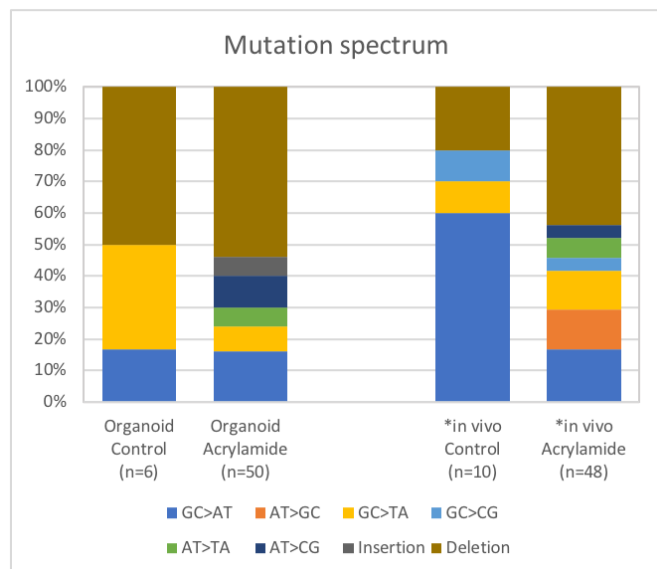


図2 肺オルガノイドを用いたAAの遺伝子変異原性試験の変異スペクトル



\* Y. Ishii *et al.* *Mutagenesis*, 2015,30,227-235

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、3Rの原則に則り、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

D. 考察

初めてマウスにおけるアクリルアミドのがん原性が報告されて久しいが、最も汎用されている遺伝毒性試験であるAmes試験ではS9 mixの存在の有無にかかわらず陰性の結果となっている。しかし今回、オルガノイドを用いた実験では高濃度群において約4倍の変異頻度の上昇が観察された。この矛盾の理由として、代謝酵素であるCYP2E1の影響が考えられる。アクリルアミドは体内でCYP2E1により代謝を受け、グリシドアミドへと変化し、これがDNA付加体を形成しゲノム変異を誘発すると考えられている。事実、グリシドアミドはS9 mixの存在の有無にかかわらずAmes試験陽性と報告されている。Ames試験で汎用されているS9にはCYP2E1が殆ど含まれておらず、アクリルアミドの遺伝毒性の本態と考えられるグリシドアミドへの変換が起らないため、結果が陰性となるのではないかと考えられている。本研究では、Ames試験で使用しているS9と同じS9を用いているが、アクリルアミド高用量群で優位に変異頻度の上昇が観察された。このことから、使用したマウス由来の肺オルガノイドがCYP2E1を有していることが推測され、現在、この代謝酵素の発現について調べているところである。

E. 健康危険情報  
特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putschroen O, Suwanpimolkul G,

Jantarabenjakul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE., Kurane I. (2021) U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, *Virology*, 555, 71-77.

- Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. (2021) New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.*, 112, 7-15.
- Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H. (2020) Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 96, 180-187.
- Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. (2020) Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 33, 1907-1914.
- Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. (2020) Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ.* 42, 16.
- 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. (2020) Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis.* 41, 368-376.

2. 学会発表

- 戸塚ゆ加里 NGSによるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望 第47回日本毒性学会学術年会シンポジウム(2020年6月 Web開催)
- 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 がん予防学術大会(2020年9月 Web開催)
- 戸塚ゆ加里 Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach 第79回癌学会(2020年10月、広島)
- 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによりがんの要

- 因を解明する 第2回 三陸包括的緩和医療研究会 (2020年10月 Web開催)
5. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第49回 環境変異原学会 (2020年9月、静岡)
6. 戸塚ゆ加里 発がん性評価法としてのDNAアクトーム解析の展望 第37回 日本毒性病理学会 (2021年1月、Web開催)
7. 戸塚ゆ加里 発がん性評価法としてのDNAアクトーム解析の展望 第12回 JBFシンポジウム (2021年3月、Web開催)
- (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得  
該当なし
  2. 実用新案登録  
該当なし
  3. その他  
該当なし



## オルガノイドを用いる遺伝毒性試験の技術整備

研究分担者 三好規之 静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

## 研究要旨

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

## A. 研究目的

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

胞からDNAを抽出し、パッケージング操作およびコロニー数のカウントを行った。本年度は、これまでに取得したコロニーのシーケンス解析を行い、アクリルアミド処理による変異パターンを検討した。

## B. 研究方法

爪楊枝で採取したコロニーをPCR溶液に添加・懸濁した。PCRプライマーは、gptP1 forward; TAC CAC TTT ATC CCG CGT CAG GおよびgptP2 reverse; A CA GGG TTT GGC TCA GGT TTG Cを用いて、94℃ 4.5分ののち、94℃ 30秒、58℃ 30秒、72℃ 2分を30サイクル後、72℃ 5分で、740 bpを増幅させた。アガロースゲル電気泳動にてシングルバンドであることを確認したPCR後の溶液1 μLと、シーケンスプライマー（9.6 pmol）混合し、シーケンス解析を行った（ユーロフィンジェノミクス株式会社）。シーケンスプライマー配列は以下である。gptA2 forward; T CT CGC GCA ACC TAT TTT CCC。シーケンス後のDNA配列を解析し、変異パターンを検討した。

## C. 研究結果

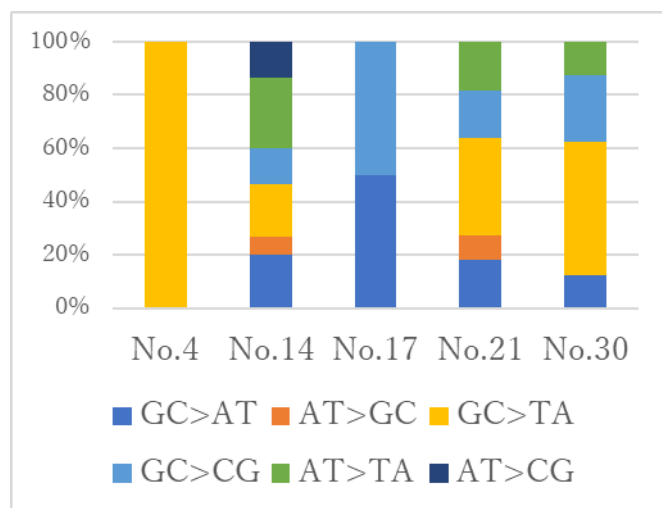
以下に計3回行ったアッセイで得られたコロニー数をまとめた表を示す。

Assay Date	Assay sample	6-TG(-)		Average	6-TG(+)					Total	Titer	Confirmation	MF
2020.02.14	Control_1	1	2	1.5	6	3	2	6	5	22	4,500	0	0
2020.02.14	Control_2	1	0	0.5	2	3	5	7	4	21	1,500	0	0
2020.02.14	Control_3	1	3	2	4	3	1	5	3	16	6,000	0	0
2020.02.14	0.28 mM AA_1	4	2	3	4	4	5	3	3	19	9,000	0	0
2020.02.14	0.28 mM AA_2	3	5	4	5	2	2	1	3	13	12,000	0	0
2020.02.14	0.28 mM AA_3	2	7	4.5	5	3	1	2	2	13	13,500	0	0
2020.02.14	1.4 mM AA_1	2	3	2.5	7	6	6	2	2	23	7,500	0	0
2020.02.14	1.4 mM AA_2	1	1	1	8	4	3	3	4	22	3,000	0	0
2020.02.14	1.4 mM AA_3	2	1	1.5	7	11	7	5	3	33	4,500	0	0

Assay Date	Assay sample	6-TG(-)		Average	6-TG(+)				Total	Titer	Confirmation	MF	
2019.11.12	Control_1	26	14	20	5	0	3	0	8	60000	0	0	
2019.11.12	Control_2	13	18	15.5	0	1	0	0	3	46500	0	0	
2019.11.30	Control_3	4	6	5	0	0	0	0	0	15000	0	0	
2019.11.12	0.28 mM AA_1	7	1	4	3	5	5	2	4	12000	0	0	
2019.11.12	0.28 mM AA_2	3	4	3.5	0	0	0	0	0	10500	0	0	
2019.11.30	0.28 mM AA_3	15	25	20	0	0	0	0	0	60000	0	0	
2019.11.12	1.4 mM AA_1	19	21	20	1	0	0	1	5	7	60000	0	
2019.11.30	1.4 mM AA_2	5	6	5.5	5	4	1	2	0	12	16500	6	0.000364
2019.11.30	1.4 mM AA_3	9	11	10	1	0	0	1	5	7	30000	2	6.67E-05

Assay Date	Assay sample	6-TG(-)		Average	6-TG(+)				Total	Titer	Confirmation	MF	
2019.10.11	Control_1	50	36	43	1	0	1	2	0	4	129000	0	0
2019.10.11	Control_2	25	20	22.5	0	1	0	0	0	1	67500	0	0
2019.10.11	Control_3	14	13	13.5	0	1	0	0	5	6	40500	0	0
2019.10.11	0.28 mM AA_1	9	4	6.5	1	0	1	4	2	8	19500	0	0
2019.10.11	0.28 mM AA_2	24	40	32	0	0	0	3	5	8	96000	0	0
2019.10.11	0.28 mM AA_3	84	338	211	2	3	0	0	0	5	633000	0	0
2019.10.11	1.4 mM AA_1	16	19	17.5	3	1	7	6	5	22	52500	0	0
2019.10.11	1.4 mM AA_2	9	11	10	18	21	22	28	19	108	30000	60	0.002
2019.10.11	1.4 mM AA_3	20	27	23.5	0	0	2	1	0	3	70500	0	0

コントロール、0.28 mMおよび1.4 mM アクリルアミド (AA) 曝露を各n=3で行うアッセイを3回繰り返した。いずれにおいてもコントロール (Control) および0.28 mM AA群におけるmutation frequency (MF) は0であった。1.4 mM AA群では計68のコロニーを確認したが、アッセイ試行毎の結果にばらつきが大きかった。これら68のコロニーのうち、釣菌可能な35コロニーについてPCR後シーケンス解析に供した。35シーケンスのうち5配列についての変異パターンを以下に示す。本解析で得られた主要な変異の一つG->Tが既存のデータとしておおむね一致している。今後、突然変異の検出に十分な数の変異コロニーを取得し、オルガノイドを用いた遺伝毒性試験について、基礎的なデータ蓄積を継続する。



## D. 研究発表

### 1. 論文発表

Zhou T, Hirayama Y, Tsunematsu Y, Suzuki N, Tanaka S, Uchiyama N, Goda Y, Yoshikawa Y, Iwashita Y, Sato M, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K. Isolation of new colibactin metabolites from wild-type *Escherichia coli* and *in situ* trapping of a mature colibactin derivative. *J. Am. Chem. Soc.*, (2021) in press

Matsuyama H, Tanaka W, Miyoshi N, Miyazaki T, Michimoto H, Sakakibara H. Beneficial effects of the consumption of sun-dried radishes

(*Raphanus sativus* cv. YR-Hyuga-Risou) on dyslipidemia in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Food Biochem.*, (2021) in press.

Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura T, Totsuka Y, Wakabayashi K, \*Miyoshi N. *o*-anisidine dimer, 2-methoxy-*N*-(2-methoxyphenyl) benzene-1,4-diamine, in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, (2021) **34**, 912-919.

Numata M, Hirano A, Yamamoto Y, Yasuda M, Miura N, Sayama K, Shibata MA, Asai T, Oku N, Miyoshi N, Shimoi K. Metastasis of breast cancer promoted by circadian rhythm disruption due to light/dark shift and its prevention by dietary quercetin in mice. *J. Circadian Rhythms*, (2021) **19**, 1-13.

Yamamoto S, Kato S, Senoo N, Miyoshi N, Morita A, Miura S. The difference of phosphatidylcholine profile and identification of characteristic phosphatidylcholine molecules in meat animal species and meat cut locations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2021) in press.

Hayakawa S, Ohishi T, Miyoshi N, Oishi Y, Nakamura Y, \*Isemura M. Anti-cancer Effects of Green Tea Epigallocatechin-3-gallate and Coffee Chlorogenic Acid. (Review) *Molecules*, (2020) **25**, 4553.

Watanabe D, Murakami H, Ohno H, Tanisawa K, Konishi K, Tsunematsu Y, Sato M, Miyoshi N, Wakabayashi K, Watanabe K, \*Miyachi M. Association between dietary intake and the prevalence of tumorigenic bacteria in the gut microbiota of middle-aged Japanese adults. *Sci. Rep.*, (2020) **10**, 15221.

\*Kato Y, Kishi Y, Okano Y, Kawai M, Shismizu M, Suga N, Yakemoto C, Kato M, Nagata A, Miyoshi N. Methylglyoxal binds to amines in honey matrix and 2'-methoxyacetophenone is released in gaseous form into headspace on heating of manuka honey. *Food Chemistry*, (2020) **337**, 127789.

Senoo N, Miyoshi N, Kobayashi E, Morita A, Tanihata J, Takeda S, \*Miura S. Glycerophospholipid profile alterations are associated with murine muscle-wasting phenotype. *Muscle Nerve*, (2020) **62**, 413-418.

\*Miyoshi N, Tanabe H, Suzuki T, Saeki K, Hara Y. Applications of a standardized green tea catechin preparation for viral warts and human papilloma virus-related and unrelated cancers. (Review) *Molecules*, (2020) **25**, 2588.

\*Yoshikawa Y, Tsunematsu Y, Matsuzaki N, Hirayama Y, Higashiguchi F, Sato M, Iwashita Y, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K. Characterization of colibactin-producing *Escherichia coli* isolated from Japanese patients with colorectal cancer. *Jpn. J. Infect. Dis.*, (2020) **73**, 437-442.

Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura T, Totsuka Y, Wakabayashi K, \*Miyoshi N. Novel *o*-toluidine metabolite in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, (2020) **33**, 1907-1914.

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

Shimba Y, Katayama K, Miyoshi N, Ikeda M, Morita A, \*Miura S.  $\beta$ -aminoisobutyric acid suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Biol. Pharm. Bull.*, (2020) **43**, 1016-1019.

Matsuzaki K, Iwai K, Yoshikawa Y, Shimamura Y, Miyoshi N, Hiramoto S, Asada K, Fukutomi R, Su H, \*Ohashi N. Wheat bran intake enhances to secrete bacteria-binding IgA into a lumen of the intestinal tract by the increment of short chain fatty acid production through the modulation of gut microbiota. *Nat. Prod. Commun.*, (2020) **15**, 1934578X2091779.

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

\*Kawanishi M, Shimohara C, Oda Y, Hisatomi Y, Tsunematsu Y, Sato M, Hirayama Y, Miyoshi N, Iwashita Y, Yoshikawa Y, Sugimura H, Mutoh M,

Ishikawa H, Wakabayashi K, Yagi T, Watanabe K. Genotyping of a gene cluster for production of colibactin and in vitro genotoxicity analysis of *Escherichia coli* strains obtained from the Japan Collection of Microorganisms. *Genes and Environment*, (2020) 42, 11.

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

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

## 2. 学会発表

市田日和、梅林脩平、赤堀拓、妹尾奈波、佐藤友紀、三好規之、吉田卓矢、守田昭仁、杉浦悠毅、井上菜穂子、川名裕己、青木淳賢、藤井宣晴、眞鍋康子、亀井康富、三浦進司：LPGAT1が筋線維タイプにおけるリン脂質クオリティと機能の相違を生み出す、第62回日本脂質生化学会（東京）、2020年5/14-15

小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之：*o*-Anisidine曝露ラット尿中代謝物の探索、日本環境変異原学会 第49回大会（沼津・オンライン）、2020年11/26-27

植嶋亜衣、久富優太、小田美光、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、八木孝司、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜：日本人腸がん患者から単離したコリバクチン産生大腸菌による小核誘導と遺伝毒性機構の解析、日本環境変異原学会 第49回大会（沼津・オンライン）、2020年11/26-27

川西優喜、小田美光、久富優太、植嶋亜衣、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、八木孝司、若林敬二、渡辺賢二：腸内細菌が産生する変異原物質コリバクチン、日本環境変異原学会 第49回大会（沼津・オンライン）、2020年11/26-27

松山弘希、田中航、三好規之、宮崎達雄、道本英之、榊原啓之：天日干しおよび生ダイコン摂取の血中トリグセド低下効果、JSOFF（宮崎・オンライン）、2020年11/28-29

小林琢磨、塩地雄大、吉田卓矢、小田切友佳、笹田達也、三好規之：スピルリナ摂取ラットにおけるタンパク質消化吸収・生体利用解析、日本農芸化学会2021（仙台・オンライン）、2021年3/18-21

松田真弥、恒松雄太、尾形勇二、蜂矢 志保実、岸本真治、三好規之、渡辺賢二：ヒト培養細胞を宿主とした抗生物質の生産、日本農芸化学会2021（仙台・オンライン）、2021年3/18-21

## E. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## オルガノイドを用いた新規発がんモデルの作成

研究分担者 筆宝義隆 千葉県がんセンター・研究所・発がん制御研究部長

## 研究要旨

遺伝子変異の蓄積はがんの大きな特徴であり、がんゲノム解析の急速な進展に伴い多数の遺伝子異常が報告されている。しかし、遺伝子改変マウスの作製などにより実際に発がんへの関与が証明されたものはごく一部であり、検証の迅速化・簡便化が求められていた。3次元オルガノイド培養法の確立により様々な組織の正常細胞の長期培養が可能になったことを受けて、我々はマウスオルガノイドへのレンチウイルス感染により複数遺伝子異常を再構成した上で、ヌードマウス皮下で短期間に腫瘍形成を誘導する実験系を様々な臓器に対して確立してきた。胃がんに関しては、がん関連遺伝子の改変マウスがもともと少ない上に動物化学発がんモデルでも発がん抵抗性を示すことが多いから、新規モデルの確立が長年の課題となっていた。そこで、我々はマウス正常胃オルガノイドに単独または複数の遺伝子異常を再現することで、ヌードマウス皮下において多様な悪性度を示す腫瘍を昨年度までに作成した。今年度は本モデルに発がん性物質 MNU および DMBA 投与を組み合わせることで新たにオルガノイド培養に基づく胃化学発がんモデルの確立を試みた。

## A. 研究目的

食品添加物等の生体における発がん性は従来動物への長期投与による評価が標準的だったが、時間と労力を要することや世界的な3Rの推進の潮流もあり、代替法開発が喫緊の課題となっていた。我々は消化器系および女性生殖器系のマウスオルガノイドを用いて、遺伝子変異の組み合わせにより協調的に発がんを誘導するモデルをこれまでに複数確立してきた。胃は化学物質に対する発がん性が低いこと、遺伝子改変マウスが少ないことが知られていたため、昨年度までに胃オルガノイド発がんモデルを確立し、弱い発がん性を示す遺伝子異常の組み合わせを同定していた。本年度は弱い発がん性を示すオルガノイドに発がん性物質を追加投与することで、癌化誘導が可能か検証を行うこととした。

## B. 研究方法

## (1) マウス胃オルガノイドの培養

マウスにおいては胃の口側半分は扁平上皮であり、ヒトの胃に相当するのは肛門側の腺胃にあたる。十分なマージンをもって腺胃を単離し、物理的な剪断と酵素処理によって上皮腺管を単離し、固化したマトリゲル上に散布した。メディアウムは腸管同様、Advanced DMEM/F12 に EGF, R-spondin1, Noggin, Y27632 (ROCK阻害剤)、CHIR99021 (GSK3阻害剤) を添加したものを用いた。p53のコンディショナルアレルのホモマウス（以下p53<sup>f/f</sup> と表記する）、および

Apcのコンディショナルtruncationホモ変異マウス (Apc<sup>580Sf/f</sup>) との二重変異マウスを用いた。

## (2) レンチウイルス感染

ベクターとしてはpLK0.1の骨格にCreおよび shRNAを組み込んだものを使用した。HEK293FT細胞を用いてレンチウイルスを作成し、濃縮・凍結を行い使用時に解凍した。オルガノイドの感染は単一細胞にまで分散させた上で、マトリゲル上で一晚共培養することで行った。当該遺伝子の組み替えはゲノムPCRで確認し、標的遺伝子のノックダウンはpuromycinによる薬剤選択後にWestern blot解析で確認した。

## (3) 化学物質投与

発がん性物質として動物モデルで汎用されるMNUおよびDMBAを遺伝子改変後の胃オルガノイドに投与した。最初に投与後72時間後の用量反応曲線を作成し、IC50を参照しながらコントロール、低濃度、高濃度の3ポイントを両化学物質に対して設定した。次に、これらの濃度で3回にわたり間欠的投与を行った後にヌードマウス皮下に接種して造腫瘍性を検証した。

## (4) 造腫瘍性の検証

1x10<sup>5</sup>個の細胞をオルガノイドのままマトリゲルと混和してヌードマウス皮下に移植し、8週間程度観察したのちに解剖を行い皮下腫瘍を単離した。半分を組織評価に用い、残りの半分は再びオルガノイド

培養を行った。組織評価としては通常のH&E染色を中心に一部免疫組織化学による評価を加えた。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

#### (1) 胃オルガノイド発がんモデルの確立

マウス胃オルガノイドへの遺伝子導入により、Cdh1に対するshRNAを用いたノックダウン、CreによるKras<sup>G12D</sup>誘導、Pic3ca<sup>H1047R</sup>誘導、p53欠失、Apc欠失、Tgfbr2欠失などを単独または組み合わせて導入した後にヌードマウス皮下へ移植したところ、基本的に単一の遺伝子変異で腫瘍形成を認めることはなく、あくまで異型性の低い腺管を少数含む小腫瘍の形成を認めるのみだった。p53欠失にCdh1ノックダウン、Kras<sup>G12D</sup>誘導、Pic3ca<sup>H1047R</sup>誘導を組み合わせると腺癌が誘導された(論文投稿中)。

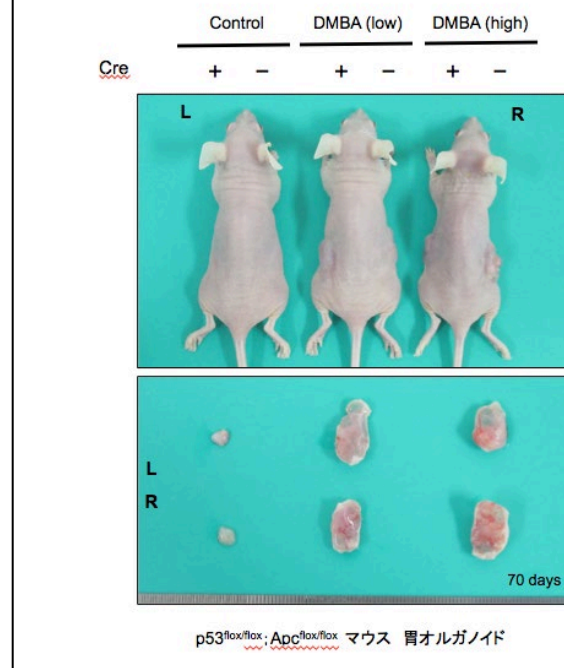
このように、基本的に腺癌またはその前癌状態が認められたが、Kras<sup>G12D</sup>とTgfbr2欠失の組み合わせにより胃では稀な扁平上皮癌が誘導された。また、他の臓器には見られない胃オルガノイドの特徴として、陰性対照のオルガノイドでもヌードマウス皮下に小腫瘍が認められることが挙げられる。ただし、異型性は全くないため、発がん性の評価には組織像と腫瘍の大きさの両面からの評価が必要と考えられた。

#### (2) 遺伝子変異オルガノイドへの化学物質投与による発がん誘導

胃がんにおける変異頻度ではp53が約半数で首位だが、Apc変異やCTNNB1変異によるWnt経路の活性化も高頻度で見られる。そこで、p53欠失とWnt経路の

活性化の発がん協調作用をオルガノイドを用いて

図1 Apc/p53 二重欠損胃オルガノイドに対するDMBA 化学発がん誘導



検討した。まず、皮下腫瘍の大きさはわずかに増大した程度に留まり、組織像についても軽度の異形にとどまっていると考えられた。ただし、Wnt経路の活性化の指標であるβカテニンの細胞膜から細胞質内及び核内への移行・蓄積自体は観察されたことからWnt経路の活性化とp53欠失の発がん協調作用は、あるとしても強いものとは考えにくかった。

遺伝子変異の再構成のみでは発がんには十分ではないp53欠失およびp53/Apc二重欠失胃オルガノイドに対し、マトリゲル培養環境でMNUおよびDMBAをコントロール、低濃度、高濃度で間欠的に3回暴露した上でヌードマウス皮下に移植した。MNU投与では変化は生じなかったが、DMBAを投与した際にp53/Apc二重欠失でのみ明らかな発がん促進効果を認めた(図1)。

### D. 考察

香料などの食由来物質は胃における発がん性の評価法の確立が急務だが、従来の動物モデルでは検出が困難だった。今回胃オルガノイド遺伝学的発がん再構成モデルと組み合わせることで初めて発がん性が評価可能な例を見出したことから、本手法の可能性を検討していくことは意義が大きいと考えられる。現在再現性の確認および症例数の追加を行っている。また、すでに毒性分野の専門家に呼びかけてFrontiers in genetics誌の特集号を企画し、こうした手法の宣伝を開始している。今後陽性例を多く蓄積することで政策提言の根拠としていきたいと考えている。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Ebisawa K, Sugiyama T, Itami M, Maru Y, **Hippo Y**, Tanaka N. A case of cervical clear cell carcinoma with serous component. *J Obstet Gynaecol Res*. 2021 doi: 10.1111/jog.14794. Epub ahead of print. PMID: 33870616.
- (2) Kato S\*, Fushimi K, Yabuki Y, Maru Y, Hasegawa S, Matsuura T, Kurotaki D, Suzuki A, Kobayashi N, Yoneda M, Higurashi T, Enaka M, Tamura T, **Hippo Y\***, Nakajima A. Precision modeling of gall bladder cancer patients in mice based on orthotopic implantation of organoid-derived tumor buds. *Oncogenesis* 10:33. 2021 (\* corresponding author) doi: 10.1038/s41389-021-00322-1
- (3) Naruse M, Masui R, Ochiai M, Maru Y, **Hippo Y**, Imai T. An organoid-based carcinogenesis model induced by in vitro chemical treatment. *Carcinogenesis*. 41; 1444-1453. 2020 doi: 10.1093/carcin/bgaa011.
- (4) Matsuura T\*, Maru Y\*, Izumiya M, Hoshi D, Kato S, Ochiai M, Hori M, Yamamoto S, Tatsuno K, Imai T, Aburatani H, Nakajima A, **Hippo Y**. Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 41; 490-501. 2020 (\*equal contribution) doi: 10.1093/carcin/bgz122.

### 2. 学会発表

- (1) 丸喜明、**筆宝義隆** (ポスター) 婦人科がん研究における患者由来オルガノイドの活用、第 24 回日本がん分子標的治療学会 (オンライン) 2020 年 10 月 6-8 日 【ベストポスター賞】
- (2) **筆宝義隆** (招待講演・シンポジウム) オルガノイド培養技術の婦人科がん領域への応用 第 21 回日本再生医療学会総会 (完全オンライン) 2021 年 3 月 11-13 日
- (3) **筆宝義隆**、丸喜明、田中尚武 (International session) 患者由来オルガノイドの婦人科正常組織および腫瘍性病変の研究への利用、第 79 回日本癌学会学術総会 (広島) 2020 年 10 月 1-3 日

- (4) 丸喜明、**筆宝義隆** (口演) オルガノイド発がんモデルが明らかにする子宮内膜の発がんおよび転移促進的な遺伝学的相互作用、第 79 回日本癌学会学術総会 (オンライン) 2020 年 10 月 1-3 日
- (5) **筆宝義隆** (招待講演・シンポジウム) オルガノイドを用いた ex vivo 発がんモデルの確立とがん予防への応用 第 27 回日本がん予防学会総会 (完全オンライン) 2020 年 9 月 15-16 日
- (6) **筆宝義隆** (招待講演) マウスおよび患者由来のがんオルガノイドモデル確立と創薬への応用、日本学術会議シンポジウム (完全オンライン) 「創薬を加速させる革新的な細胞・臓器・個体モデル」、2021 年 1 月 18 日
- (7) **筆宝義隆** (招待講演) (完全オンライン) 3次元オルガノイド培養を用いたがんの本態解明と個別化医療・創薬への応用、(株)情報機構 細胞培養セミナー (東京) 2020 年 12 月 3 日
- (8) **筆宝義隆** (招待講演) 婦人科領域における患者由来オルガノイド研究の新展開、第 4 回患者由来がんモデル講演会 (完全オンライン) 2020 年 10 月 29-30 日
- (9) 星 大輔、喜多 絵美里、丸 喜明、**筆宝 義隆** (ポスター) ヒト膵腺房細胞癌株の樹立と解析患者由来がんモデル講演会 (オンライン) 2020 年 10 月 29-30 日

## E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

## オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備

研究分担者 平田暁大 岐阜大学・応用生物科学部・助教

## 研究要旨

本分担研究課題の目的は、マウス正常組織由来オルガノイドを用いるin vitro発がん性短中期試験を多施設で実施可能な方法として確立することである。本年度は、①施設間でのオルガノイドの最適な輸送方法を確立するため、他施設にて樹立後に-80度で保存されたオルガノイドを凍結した状態で輸送し、輸送先でin vitro発がん性試験に用いることができるか検討した。さらに、②発がん物質処理後にオルガノイドに生じた形態変化を定量的に解析し、発がん性評価に有用であるか検討した。①については、6系統の肺由来オルガノイドを冷凍した状態で輸送し、輸送先において培養の可否を検討した。2系統については解凍後に培養が可能であり、1系統では発がん性試験の実施が可能であった。一方、4系統では培養が不可能であった。②については、野生型マウスの肺由来オルガノイドにアクリルアミド（0、0.28、1.4mM）を3回処置し、病理組織学的にオルガノイドの形態変化を解析したところ、アクリルアミド処置後、オルガノイドのサイズが濃度依存的に有意に増加し、高濃度のアクリルアミドに暴露したオルガノイドでは壁の重層化が観察された。一方、増殖細胞マーカーであるKi-67陽性細胞の比率に有意な差は認められなかった。

以上より、①オルガノイドの凍結、保存、培養の工程に改善の余地があるものの、凍結保存されたオルガノイドを輸送して、in vitro発がん性短中期試験に用いることが可能であることが明らかとなった。また、②化学物質投与後に生じるオルガノイドの形態変化の定量的な解析は被検物資の発がん性の評価に有用であると考えられた。

## A. 研究目的

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

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

昨年度までに、本分担研究課題において、基幹施設（国立がん研究センター）で調整されたオルガノイドを研究分担者の所属施設（岐阜大学）に常温で輸送し、培養・継代できることを明らかにした。一方で、国内の気温の変動を考えると、季節を問わない安定した輸送方法が求められる。そのため、昨年度は、安定したオルガノイドの輸送方法を確立することを目的として、冷蔵での輸送を試みたが、輸送の2日後にはほぼすべてのオルガノイドが崩壊し、継代は不可能であった。そこで、本年度は、樹立後に-80度で保存されたオルガノイドを凍結した状態で輸送し、in vitro発がん性試験に用いることができるか検討した。

さらに、昨年度、肺発がん性物質であるアクリルアミドの処置により肺由来オルガノイドに形態変化が生じることを見出した。今年度は、細胞増殖活性の評価を加えるとともに、その形態変化を定量的に解析し、発がん性評価に有用であるか検討した。

## B. 研究方法

### ① 凍結保存オルガノイドを用いた発がん性短中期試験の検討

#### ①-1. 冷凍輸送後のオルガノイドの培養

国立がん研究センターにて樹立後に-80度で保存されたオルガノイドを岐阜大学に冷凍輸送し、培養の可否を検討した。

オルガノイドは6系統の異なるマウス（野生型および *p53* (+/-) 型 C57BL/6J マウス、野生型および *p53* (+/-) 型 BALB/c マウス、野生型および *rasH2* トランスジェニック CB6F1 マウス)の肺から樹立した。オルガノイドの凍結保存には培養細胞用の凍結保存液（ラボバンカー2、倉敷紡績株式会社）を用いた。輸送時はドライアイスと同梱して、オルガノイドを凍結した状態で輸送した。岐阜大学に到着したオルガノイドは、-80度で短期間保存されたのち、解凍して、マトリゲル内に包埋して培養し、その後の増殖および継代の可否について検討した。

#### ①-2. 凍結輸送後のオルガノイドを用いた発がん性短中期試験

輸送後に培養・継代が可能であった野生型および *p53* (+/-) 型 C57BL/6J マウス肺由来オルガノイドにアクリルアミド (0, 0.28, 1.4mM) を3回処置し、オルガノイドを増殖させた後、ヌードマウス(各濃度2匹)の両側の腹側部皮下に、マトリゲルと混和したオルガノイドを接種した。接種後、8週間飼育し、接種部位の組織を病理組織学的に解析した。

### ②アクリルアミド処置後の肺オルガノイドの形態評価

野生型CB6F1マウスの肺由来オルガノイドにアクリルアミド (0, 0.28, 1.4mM) を3回処置したのち、2度継代し、その形態変化を解析した。iPge11 (ジェノスタッフ社) を用いてオルガノイドを集め、ホルマリン固定後、定法に従い、パラフィン包埋切片を作製し、H&E染色を施し観察した。パラフィン切片はKi-67に対する免疫染色にも用いた。一次抗体に、抗Ki-67モノクローナル抗体(希釈倍率: ×100, Clone: SP6, Abcam, イギリス)を用いて、定法に従って免疫染色を行った。

#### (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### ① 凍結保存オルガノイドを用いた発がん性短中期試験の検討

#### ①-1. 冷凍輸送後のオルガノイドの培養

2系統(野生型および *p53* (+/-) 型 C57BL/6J マウス)については、輸送先である岐阜大学において培養・継代が可能であった(図1)。一方、4系統(野生型および *p53* (+/-) 型 BALB/c マウス、野生型および *rasH2* トランスジェニック CB6F1 マウス)は培養が不可能であった(図2)。したがって、オルガノイドの凍結、保存、解凍後の培養の工程に改善の余地があるものの、凍結保存されたオルガノイドを輸送して培養することは可能であることが示された。

#### ①-2. 凍結輸送後のオルガノイドを用いた発がん性短中期試験

培養が可能であった野生型および *p53* (+/-) 型 C57BL/6J マウス肺由来オルガノイドを用いて、SOPに従って発がん性短中期試験を実施したが、野生型オルガノイドについては、アクリルアミド処置後の増殖過程で崩壊するオルガノイドが多かったため、マウスへの投与は中止した。*p53* (+/-) 型オルガノイドは皮下接種8週間後には、肉眼的に明らかな腫瘍形成は認められず、従来の結果と一致していた(図3)。

以上より、凍結保存されたオルガノイドを輸送して、*in vitro* 発がん性短中期試験に用いることが可能であることが明らかとなった。凍結保存されたオルガノイドを用いることができれば、必要に応じて随時試験を開始することができ、また、各施設でオルガノイドを調整する必要がなくなるため、試験の普及、安定化の面からメリットは大きい。

### ②アクリルアミド処置後の肺オルガノイドの形態評価

#### ②-1. 病理組織学的解析(

アクリルアミド処置後、オルガノイドの壁の重層化が観察された(図4)。HE標本上で、各群20個のオルガノイドについて、多層化の頻度および程度を評価した。壁が最も肥厚した部分の層数を計数したところ、3回暴露終了後2度目の継代時点で対照群と比較して1.4 mM AA暴露群で多層化の程度が有意に上昇していた(表1)。また、有意差は認められなかったものの、AA濃度依存的に多層化したオルガノイドの出現頻度が高くなる傾向が認められた(表1)。Ki-67免疫染色による細胞増殖活性の評価では、予想に反して、多層化したオルガノイドで必ずしも陽性細胞が増加してはならず、また多層化していないオルガノイドにおいて高い陽性率を示すものも認められた(図5)。対照群と比較してAA暴露群でKi-67陽性率は高かったが、有意差は認められなかった(図6)。

以上より、化学物質投与後のオルガノイドの形態変化の観察及びその定量的な評価が発がん性の評価に有用である可能性が示唆された。今回、アクリルアミド3回暴露+2回継代後の形態変化を観察したが、どのタイミングで評価するのが最適か検討していく必要がある。また、今後、他の発がん性物質でも同様の



変化が誘導されるか検討していく必要がある。マウスオルガノイドを用いたin vitro発がん性短中期試験の標準プロトコールでは、化学物質処置後のオルガノイドをヌードマウスに皮下移植して評価しているが、オルガノイド自体の評価で被検物質の発癌性を評価できるようになれば、動物数の削減につながり、動物福祉の面からメリットは大きい。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Arioka Y, [Hirata A](#), Kushima I, Aleksic B, Mori D, Ozaki N. Characterization of a schizophrenia patient with a rare *RELN* deletion by combining genomic and patient-derived cell analyses. *Schizophrenia Res.* 216:511-515, 2020
- (2) Ishida K, Tomita H, Kanayama T, Noguchi K, Niwa A, Kawaguchi M, Miyai M, Matsuo M, Imaizumi Y, Nakashima T, Kato K, Hatano Y, [Hirata A](#), Okada H, Shibata T, Hara A. Specific deletion of p16<sup>INK4a</sup> with retention of p19<sup>ARF</sup> enhances the development of invasive oral squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 190: 1332-1342, 2020
- (3) Tashita C, Hoshi M, [Hirata A](#), Kubo H, Nakamoto K, Hattori T, Yamamoto Y, Tomita H, Hara A, and Saito K. Kynurenine Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate-Induced Colitis in Mice. *World J. Gastroenterol.* 7;26(9):918-932. 2020
- (4) Kurihara T, [Hirata A](#), Yamaguchi T, Okada H, Kameda M, Sakai H, Haridy M, Yanai T. Avipoxvirus infection in two captive Japanese cormorants (*Phalacrocorax capillatus*). *J. Vet. Med. Sci.* 82(6) :817-822, 2020
- (5) Yamazaki A, Nakamura T, Miyabe-Nishiwaki T, [Hirata A](#), Inoue R, Kobayashi K, Miyazaki Y, Hamasaki Y, Ishigami A, Nagata N, Kaneko A, Koizumi M, Ohta H, Okano HJ, Murata T. The production profile of lipid metabolites in urine of marmoset with wasting syndrome. *PLoS One* 15(6): e0234634, 2020
- (6) Yoshizaki K, [Hirata A\\*](#), Nishii N, Kawabe M, Goto M, Mori T, and Sakai H. Familial Adenomatous Polyposis in Dogs: Hereditary Gastrointestinal Polyposis in Jack Russell Terriers with Germline *APC* Mutations. *Carcinogenesis*, 42(1), 70-79, 2021

- (7) Miyai M, Kanayama T, Hyodo F, Kinoshita T, Ishihara T, Okada H, Suzuki H, Takashima S, Wu Z, Hatano Y, Egashira Y, Enomoto Y, Nakayama N, Soeda A, Yano H, [Hirata A](#), Niwa M, Sugie S, Mori T, Maekawa Y, Iwama T, Matsuo M, Hara A, Tomita H. Glucose transporter Glut1 controls diffuse invasion phenotype with perineuronal satellitosis in diffuse glioma microenvironment. *Neurooncol. Adv.*3(1):1-15, 2021
- (8) Yoshizaki K, [Hirata A\\*](#), Matsushita H, Nishii N, Kawabe M, Mori T, and Sakai H. PCR-based Genotyping Assays to Detect Germline *APC* Variant Associated with Hereditary Gastrointestinal Polyposis in Jack Russell Terriers. *BMC Vet. Res.* 17(1):32, 2021
- (9) Tomita H, Tanaka K, [Hirata A](#), Okada H, Imai H, Shirakami Y, Onishi K, Sugie S, Aoki H, Hatano Y, Noguchi K, Kanayama T, Niwa A, Suzui N, Miyazaki T, Tanaka T, Akiyama H, Shimizu M, Yoshida K, and Hara A. Inhibition of FGF10-ERK signal activation suppresses intraductal papillary neoplasm of the bile duct and its associated carcinomas. *Cell Rep.* 34(8):108772, 2021
- (10) Goto M, [Hirata A](#), Murakami M, Minami N, and Sakai H. What's your diagnosis? Subcutaneous mass on the head of a dog. *Vet. Clin. Pathol.* in press

### 2. 学会発表

- (1) 入澤祐太、平田暁大、酒井洋樹、今井俊夫：アクリルアミド暴露後の肺オルガノイドの病理組織学的変化。第37回日本毒性病理学会（2021年1月、Web開催）

## E. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

該当なし。

### 2. 実用新案登録

該当なし。

### 3. その他

該当なし。

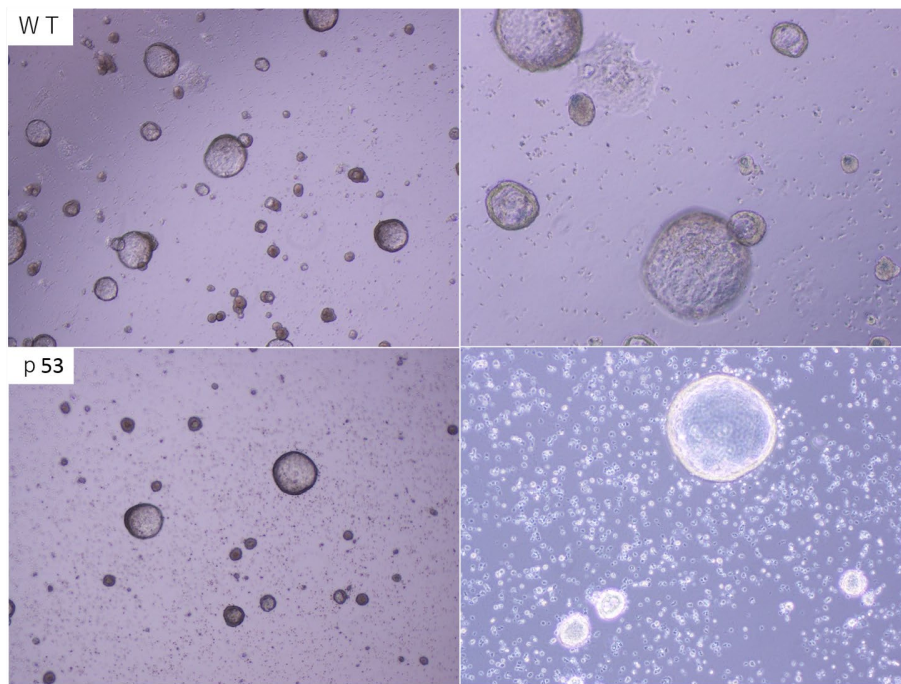


図 1. 解凍後6日目の野生型 (WT) および  $p53 (+/-)$  型 ( $p53$ ) C57BL/6マウス由来オルガノイド

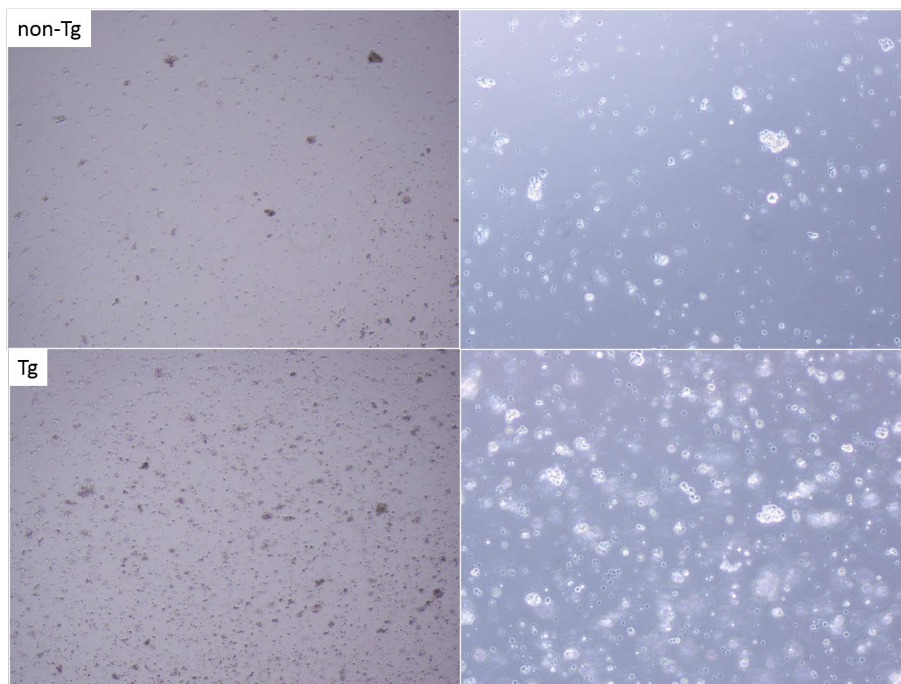


図 2. 解凍後8日目の野生型 (non-Tg) および  $rasH2$  トランスジェニック (Tg) マウス由来オルガノイド



図3. アクリルアミド処置後のオルガノイドのヌードマウスにおける造腫瘍性の検討

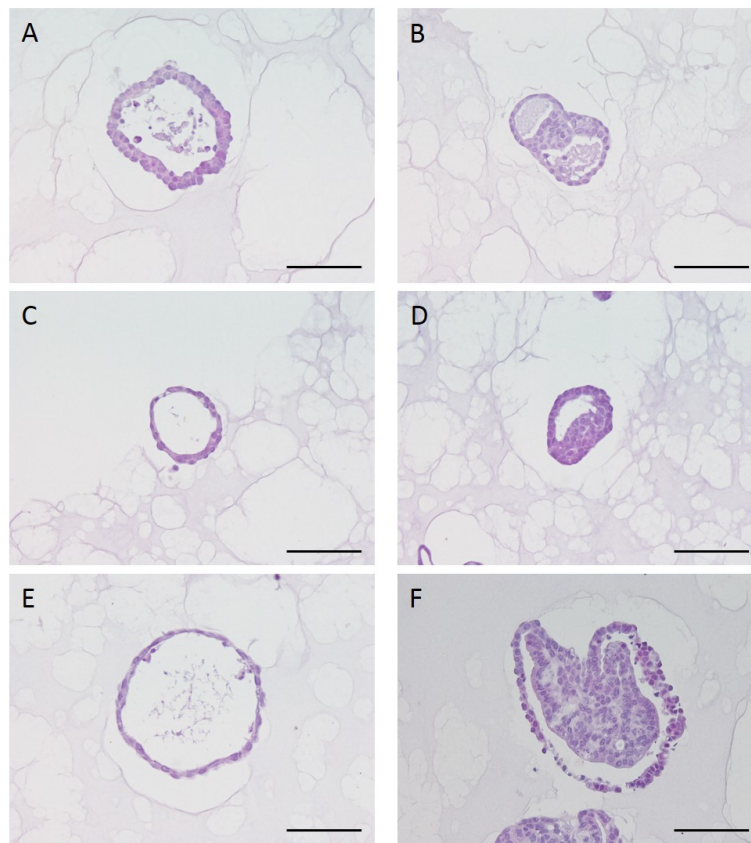


図4. アクリルアミド3回暴露後2回継代時点の野生型CB6F1マウス由来オルガノイド組織像(HE染色)  
 (A) 0 mM アクリルアミド(AA)暴露オルガノイド。多くは単層から2層の壁を有するシスト様構造を示す。  
 (B) 0 mM AA暴露オルガノイド。壁の一部が多層性に肥厚したものが散見される。  
 (C) 0.28 mM AA暴露オルガノイド。多くは単層から2層の壁を有するシスト様構造を示す。  
 (D) 0.28 mM AA暴露オルガノイド。壁の一部が多層性に肥厚したものが散見される。  
 (E) 1.4 mM AA暴露オルガノイド。単層から2層の壁を有するオルガノイドが認められる。  
 (F) 1.4 mM AA暴露オルガノイド。壁の一部が高度に肥厚したものがしばしば認められる。スケールバー: 50  $\mu$ m

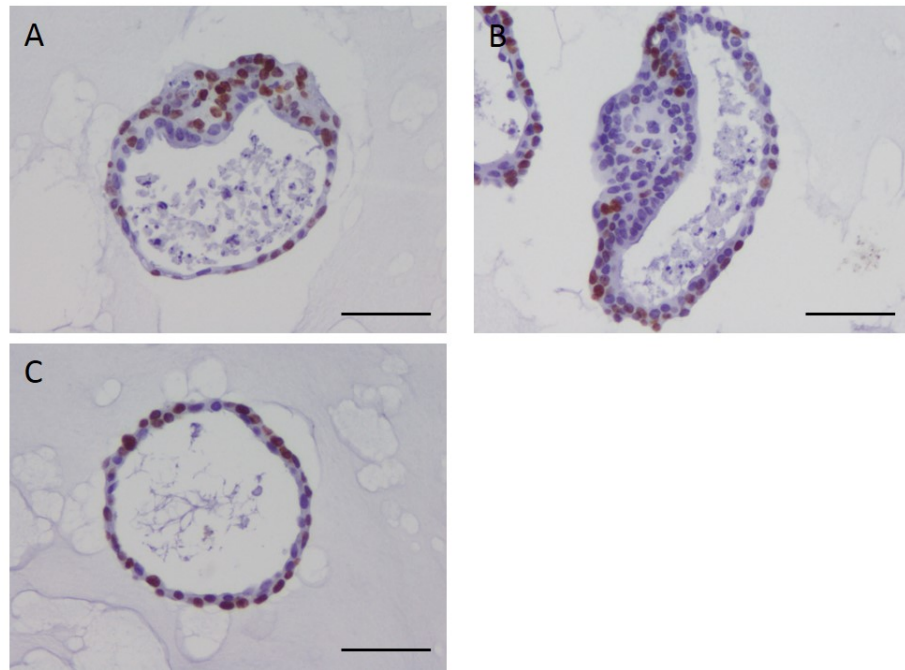


図5. アクリルアミド3回暴露後2回継代時点の野生型CB6F1マウス由来オルガノイドのKi-67免疫染色(1.4mM暴露群)  
 (A)多層化した壁において多くの細胞が核陽性を示す。(B)多層化した壁において多くの細胞が陰性を示す。  
 (C)多層化を示さないオルガノイドでも陽性率の高いものが観察される。  
 スケールバー: 50 μm

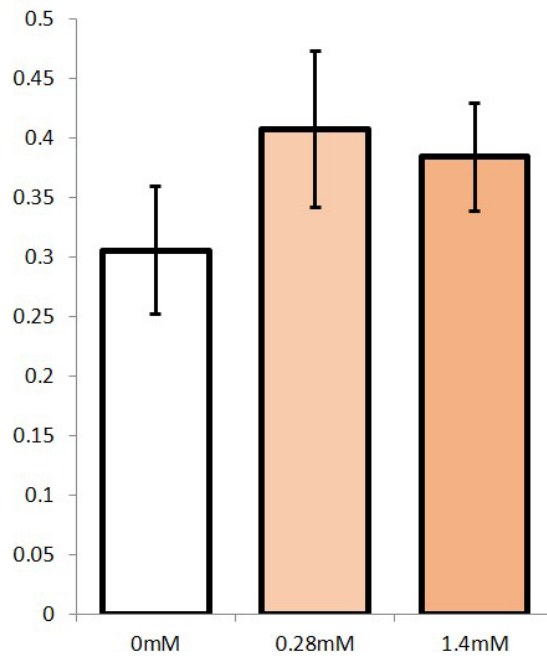


図6. アクリルアミド3回暴露後2回継代時点の野生型CB6F1マウス由来オルガノイドのKi-67陽性率(平均±標準誤差)

表 1. アクリルアミド 3 回暴露後 2 回継代時点の野生型 CB6F1 マウス由来オルガノイドの多層化の頻度と程度

	AA濃度(mM)		
	0	0.28	1.4
多層化の頻度	8/20	9/20	15/20
多層化の程度 (層)	2.7±0.30	2.7±0.25	4.5±0.60*

多層化の程度は各オルガノイドの最肥厚部の層数の平均±標準誤差を示す。

\* $p < 0.05$  by Steel-Dwass

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Honma M, Kitazawa A, Kasamatsu T, Sugiyama KI.	Screening for Ames mutagenicity of food flavor chemicals by (quantitative) structure-activity relationship.	Genes and Environment	42	32	2020
Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama KI, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M.	Development of a new quantitative structure-activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ Auto-Modeller™.	Genes and Environment	43	16	2021
Yasui M, Fukuda T, Ukai A, Maniwa J, Imamura T, Hashizume T, Yamamoto H, Shibuya K, Narumi K, Fujiishi Y, Okada E, Fujishima S, Yamamoto M, Otani N, Nakamura M, Nishimura R, Ueda M, Mishima M, Matsuzaki K, Takeiri A, Tanaka K, Okada Y, Nakagawa M, Hamada S, Kajikawa A, Honda H, Adachi J, Misaki K, Ogawa K, Honma M.	Weight of evidence approach using a TK gene mutation assay with human TK6 cells for follow-up of positive results in Ames tests: a collaborative study by MMS/JEMS.	Genes Environ.	43	7	2021
Masumura K, Yatagai F, Ochiai M, Nakagama H, Nohmi T.	Effects of the <i>scid</i> mutation on X-ray-induced deletions in the brain and spleen of <i>gpt</i> delta mice.	Genes and Environment	42	19	2020
Chen R, You X, Cao Y, Masumura K, Ando T, Hamada S, Horibata K,	Benchmark dose analysis of multiple genotoxicity endpoints in <i>gpt</i> delta	Mutagenesis		geaa034	2020

Wan J, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y.	mice exposed to aristolochic acid I.				
Ishii Y, Takasu S, Grúz P, Masumura K, Ogawa K, Nohmi T, Umemura T.	The role of DNA polymerase $\zeta$ in benzo[ <i>a</i> ]pyrene-induced mutagenesis in the mouse lung.	Mutagenesis		geab007	2021
Hagio S, Tsuji N, Furukawa S, Takeuchi K, Hayashi S, Kuroda Y, Honma M, Masumura K.	Effect of sampling time on somatic and germ cell mutations induced by acrylamide in <i>gpt</i> delta mice.	Genes and Environment	43	4	2021
Nakamura K, Ishii Y, Takasu S, Nohmi T, Shibutani M, Ogawa K.	Lack of in vivo mutagenicity of acetamide in a 13-week comprehensive toxicity study using F344 <i>gpt</i> delta rats.	Toxicological Science	177	431-440	2020
Naruse M, Masui R, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, Imai T.	An organoid-based carcinogenesis model induced by <i>in vitro</i> chemical treatment.	Carcinogenesis	41 (10)	1444-1453	2020
Matsuura T, Maru Y, Izumiya M, Hoshi D, Kato S, Ochiai M, Hori M, Yamamoto S, Tasuno K, Imai T, Aburatani H, Nakajima A, Hippo Y.	Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis.	Carcinogenesis	41 (4)	490-501	2020
Naruse, M., Ochiai, M., Sekine, S., Taniguchi, H., Yoshida, T., Ichikawa, H., Sakamoto, H., Kubo, T., Matsumoto, K., Ochiai, A., Imai, T.	Re-expression of REG family and DUOXs genes in CRC organoids by co-culturing with CAFs.	Sci. Rep.	11	2077	2021
Yagishita, S., Kato, K., Takahashi, M., Imai, T., Yatabe, Y., Kuwata, T., Suzuki, M., Ochiai, A., Ohtsu, A., Shimada, K., Nishida, T., Hamada, A., Mano, H.	Characterization of the large-scale Japanese patient-derived xenograft (J-PDX) library.	Cancer Sci.			In press
Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabjenjakul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I.	U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim,	Virology	555	71-77	2021
Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y.	New horizons of DNA adductome for exploring	Cancer Sci.	112	7-15	2021

	environmental causes of cancer.				
Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H.	Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane.	Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.	96	180-187	2020
Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N.	Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis.	Chem Res Toxicol.	33	1907-1914	2020
Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T.	Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts.	Genes Environ.	42	16	2020
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.	41	368-376	2020
Zhou T, Hirayama Y, Tsunematsu Y, Suzuki N, Tanaka S, Uchiyama N, Goda Y, Yoshikawa Y, Iwashita Y, Sato M, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K.	Isolation of new colibactin metabolites from wild-type Escherichia coli and in situ trapping of a mature colibactin derivative.	J. Am. Chem. Soc.			In press
Matsuyama H, Tanaka W, Miyoshi N, Miyazaki T, Michimoto H, Sakakibara H.	Beneficial effects of the consumption of sun-dried radishes (Raphanus sativus cv. YR-Hyuga-Risou) on dyslipidemia in apolipoprotein E-deficient mice.	J. Food Biochem.			In press
Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N.	$\sigma$ -anisidine dimer, 2-methoxy- <i>N</i> -(2-methoxyphenyl) benzene-1,4-diamine, in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis.	Chem. Res. Toxicol.	34	912-919	2021
Numata M, Hirano A, Yamamoto Y, Yasuda M, Miura N, Sayama K.	Metastasis of breast cancer promoted by circadian rhythm	J. Circadian Rhythms	19	1-13	2021



Shibata MA, Asai T, Oku N, Miyoshi N, Shimoi K.	disruption due to light/dark shift and its prevention by dietary quercetin in mice.				
Yamamoto S, Kato S, Senoo N, Miyoshi N, Morita A, Miura S.	The difference of phosphatidylcholine profile and identification of characteristic phosphatidylcholine molecules in meat animal species and meat cut locations.	Biosci. Biotechnol. Biochem.			In press
Hayakawa S, Ohishi T, Miyoshi N, Oishi Y, Nakamura Y, Isemura M.	Anti-cancer Effects of Green Tea Epigallocatechin-3-gallate and Coffee Chlorogenic Acid.	Molecules	25	4553	2020
Watanabe D, Murakami H, Ohno H, Tanisawa K, Konishi K, Tsunematsu Y, Sato M, Miyoshi N, Wakabayashi K, Watanabe K, Miyachi M.	Association between dietary intake and the prevalence of tumorigenic bacteria in the gut microbiota of middle-aged Japanese adults.	Sci. Rep.	10	15221	2020
Kato Y, Kishi Y, Okano Y, Kawai M, Shismizu M, Suga N, Yakemoto C, Kato M, Nagata A, Miyoshi N.	Methylglyoxal binds to amines in honey matrix and 2'-methoxyacetophenone is released in gaseous form into headspace on heating of manuka honey.	Food Chemistry	337	127789	2020
Senoo N, Miyoshi N, Kobayashi E, Morita A, Tanihata J, Takeda S, Miura S.	Glycerophospholipid profile alterations are associated with murine muscle-wasting phenotype.	Muscle Nerve.	62	413-418	2020
Miyoshi N, Tanabe H, Suzuki T, Saeki K, Hara Y.	Applications of a standardized green tea catechin preparation for viral warts and human papilloma virus-related and unrelated cancers.	Molecules	25	2588	2020
Yoshikawa Y, Tsunematsu Y, Matsuzaki N, Hirayama Y, Higashiguchi F, Sato M, Iwashita Y, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K.	Characterization of colibactin-producing Escherichia coli isolated from Japanese patients with colorectal cancer.	Jpn. J. Infect. Dis.	73	437-442	2020
Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura T, Totsuka Y,	Novel o-toluidine metabolite in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis.	Chem. Res. Toxicol.	33	1907-1914	2020

Wakabayashi K, Miyoshi N.					
Sanada S, Suzuki T, Nagata A, Hashidume T, Yoshikawa Y, Miyoshi N.	Intestinal microbial metabolite stercobilin involvement in the chronic inflammation of ob/ob mice.	Sci. Rep.	10	6479	2020
Shimba Y, Katayama K, Miyoshi N, Ikeda M, Morita A, Miura S.	$\beta$ -aminoisobutyric acid suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E- knockout mice.	Biol. Pharm. Bull.	43	1016-1019	2020
Matsuzaki K, Iwai K, Yoshikawa Y, Shimamura Y, Miyoshi N, Hiramoto S, Asada K, Fukutomi R, Su H, Ohashi N.	Wheat bran intake enhances to secrete bacteria-binding IgA into a lumen of the intestinal tract by the increment of short chain fatty acid production through the modulation of gut microbiota.	Nat. Prod. Commun.	15	1934578X 2091779	2020
Uchikawa M, Kato M, Nagata A, Sanada S, Yoshikawa Y, Tsunematsu Y, Sato M, Suzuki T, Hashidume T, Watanabe K, Yoshikawa Y, Miyoshi N.	Elevated levels of proinflammatory volatile metabolites in feces of high fat diet fed KK-Ay mice.	Sci. Rep.	10	5681	2020
Kawanishi M, Shimohara C, Oda Y, Hisatomi Y, Tsunematsu Y, Sato M, Hirayama Y, Miyoshi N, Iwashita Y, Yoshikawa Y, Sugimura H, Mutoh M, Ishikawa H, Wakabayashi K, Yagi T, Watanabe K.	Genotyping of a gene cluster for production of colibactin and in vitro genotoxicity analysis of <i>Escherichia coli</i> strains obtained from the Japan Collection of Microorganisms.	Genes and Environment	42	11	2020
Sarmales-Murga C, Akaoka F, Sato M, Takanishi J, Mino T, Miyoshi N, Watanabe K.	A new class of dimeric product isolated from the fungus <i>Chaetomium</i> <i>globosum</i> : Evaluation of chemical structure and biological activity.	J. Antibiot.	73	320-323	2020
Kondo T, Saigo S, Ugawa S, Kato M, Yoshikawa Y, Miyoshi N, Tanabe K.	Prebiotic effect of fructooligosaccharides on the inner ear of DBA/2J mice with early-onset progressive hearing loss.	J. Nutr. Biochem.	75	108247	2020
Ebisawa K, Sugiyama T, Itami M, Maru Y, Hippo Y, Tanaka N.	A case of cervical clear cell carcinoma with serous component.	J Obstet Gynaecol Res.		doi: 10.1111/jo g.14794	2021
Kato S, Fushimi K, Yabuki Y, Maru Y, Hasegawa S, Matsuura T, Kurotaki D, Suzuki A, Kobayashi N, Yoneda	Precision modeling of gall bladder cancer patients in mice based on orthotopic implantation of organoid- derived tumor buds.	Oncogenesis	10	33	2021

M, Higurashi T, Enaka M, Tamura T, Hippo Y, Nakajima A.					
Arioka Y, Hirata A, Kushima I, Aleksic B, Mori D, Ozaki N.	Characterization of a schizophrenia patient with a rare RELN deletion by combining genomic and patient-derived cell analyses.	Schizophrenia Res.	216	511-515	2020
Ishida K, Tomita H, Kanayama T, Noguchi K, Niwa A, Kawaguchi M, Miyai M, Matsuo M, Imaizumi Y, Nakashima T, Kato K, Hatano Y, Hirata A, Okada H, Shibata T, Hara A.	Specific deletion of p16 <sup>INK4a</sup> with retention of p19 <sup>ARF</sup> enhances the development of invasive oral squamous cell carcinoma.	Am. J. Pathol.	190	1332-1342	2020
Tashita C, Hoshi M, Hirata A, Kubo H, Nakamoto K, Hattori T, Yamamoto Y, Tomita H, Hara A, Saito K.	Kynurenine Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate-Induced Colitis in Mice.	World J. Gastroenterol.	7;26(9)	918-932	2000
Kurihara T, Hirata A, Yamaguchi T, Okada H, Kameda M, Sakai H, Haridy M, Yanai T.	Avipoxvirus infection in two captive Japanese cormorants ( <i>Phalacrocorax capillatus</i> ).	J. Vet. Med. Sci.	82(6)	817-822	2020
Yamazaki A, Nakamura T, Miyabe-Nishiwaki T, Hirata A, Inoue R, Kobayashi K, Miyazaki Y, Hamasaki Y, Ishigami A, Nagata N, Kaneko A, Koizumi M, Ohta H, Okano HJ, Murata T.	The production profile of lipid metabolites in urine of marmoset with wasting syndrome.	PLoS One	15(6)	e0234634	2020
Yoshizaki K, Hirata A, Nishii N, Kawabe M, Goto M, Mori T, and Sakai H.	Familial Adenomatous Polyposis in Dogs: Hereditary Gastrointestinal Polyposis in Jack Russell Terriers with Germline APC Mutations.	Carcinogenesis	42(1)	70-79	2021
Miyai M, Kanayama T, Hyodo F, Kinoshita T, Ishihara T, Okada H, Suzuki H, Takashima S, Wu Z, Hatano Y, Egashira Y, Enomoto Y, Nakayama N, Soeda A, Yano H, Hirata A, Niwa M, Sugie S, Mori T, Maekawa Y, Iwama T, Matsuo M, Hara A, Tomita H.	Glucose transporter Glut1 controls diffuse invasion phenotype with perineuronal satellitosis in diffuse glioma microenvironment.	Neurooncol.	3(1)	1-15	2021
Yoshizaki K, Hirata A, Matsushita H, Nishii N,	PCR-based Genotyping Assays to Detect	BMC Vet. Res.	17(1)	32	2021

Kawabe M, Mori T, and Sakai H.	Germline APC Variant Associated with Hereditary Gastrointestinal Polyposis in Jack Russell Terriers.				
Tomita H, Tanaka K, Hirata A, Okada H, Imai H, Shirakami Y, Onishi K, Sugie S, Aoki H, Hatano Y, Noguchi K, Kanayama T, Niwa A, Suzui N, Miyazaki T, Tanaka T, Akiyama H, Shimizu M, Yoshida K, and Hara A.	Inhibition of FGF10–ERK signal activation suppresses intraductal papillary neoplasm of the bile duct and its associated carcinomas.	Cell Rep.	34(8)	108772	2021
Goto M, Hirata A, Murakami M, Minami N, and Sakai H.	What’s your diagnosis? Subcutaneous mass on the head of a dog.	Vet. Clin. Pathol.			In press

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸彦

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利用については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部 部長  
(氏名・フリガナ) 杉山 圭一 (スギヤマ ケイイチ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



令和3年3月29日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部 室長  
(氏名・フリガナ) 増村 健一 (マスマラ ケンイチ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

令和3年4月1日

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

機関名 国立研究開発法人国立

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 中釜 齊

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反の管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年4月1日

厚生労働大臣  
(~~国立がん研究センター~~ 長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立研究開発法人国立がん研究センター

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 中釜 齊

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

#### 4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

#### 6. 利益相反の管理

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

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

令和3年5月13日

厚生労働大臣 殿

機関名 静岡県立

所属研究機関長 職名 学長

氏名 尾池 和

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び審査結果については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全性確保推進研究事業
- 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 食品栄養環境科学研究所・客員共同研究員  
(氏名・フリガナ) 落合 雅子・オチアイ マサコ
- 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

#### 6. 利益相反の管理

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

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

令和3年5月10日

厚生労働大臣 殿

機関名 静岡県立大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 尾池 和夫

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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



2021年4月1日

厚生労働大臣 殿

機関名 千葉県がんセンター

所属研究機関長 職名 病院長

氏名 飯 笹 俊 彦

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全性確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究 (H30-食品一般-003 )
- 3. 研究者名 (所属部署・職名) 研究所 発がん制御研究部・部長  
(氏名・フリガナ) 筆宝 義隆 (ヒッポウ ヨシタカ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:文部科学省 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 )	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	千葉県がんセンター動物実験管理委員会	<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項) \_\_\_\_\_

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人東海国立大学機構

所属研究機関長 職名 機構長

氏名 松尾 清 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 応用生物科学部・助教  
(氏名・フリガナ) 平田 暁大・ヒラタ アキヒロ
- 4. 倫理審査の状況 該当性の有無が有の場合は、審査を受けた研究課題番号を記載 : H30-食品-一般-003

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

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

その他 (特記事項)

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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