

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鱒淵 英機

令和3年(2021)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキーム の創出に関する研究	----- 1
鰐渕英機	
II. 分担研究報告	
1. 遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立	----- 10
鰐渕英機	
2. 遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立	----- 13
鈴木周五	
3. 遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立	----- 16
豊田武士	
4. 遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立	----- 19
横平政直	
5. 遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立	----- 23
加藤寛之	
6. 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立	----- 27
魏 民	
7. DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価	----- 30
戸塚ゆ加里	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 34

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和2年度総括研究報告書

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
(20KD0101)

研究代表者 鰐淵 英機 大阪市立大学 分子病理学 教授

研究要旨

本研究では化学物質の標的となる臓器の大半は肝臓であることに着目し、肝発がん性を短期で高精度に検証できるシステムを確立するとともに、問題となる「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」について発がん性評価を行う。非遺伝毒性肝発がん物質に対する検出法の確立を目指し、本年度は非遺伝毒性肝発がん物質 11 種類と、非発がん物質 5 種類の合計 16 種について検討した。ラット 28 日間反復投与試験に基づき投与した肝臓における遺伝子発現情報をマイクロアレイにより取得し、我々が構築した非遺伝毒性肝発がん物質検出法の改良を行い、肝発がん性を予測した。その結果、感度 45% (5/11 物質)、特異度 100% (5/5) の結果が得られ、過去に検討した化学物質の結果と合わせて、感度 65%、特異度 98%、正答率が 86% の高い精度で検出できる可能性が示唆された。遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の有用性の検証では、「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」を含む 6 化学物質について検討した結果、「陽性」と判定されたものは、2 遺伝毒性肝発がん物質であった。しかし、「優先評価化学物質」の phenylenediamine を含めたそれ以外の 3 遺伝毒性肝発がん物質は「陰性」と判定された。遺伝毒性陽性で発がん性不明の「監視化学物質」DB-134 は「陰性」と判定された。今後、検出精度を確認するに、偽陰性物質について投与量を上げて再評価する必要があると考えられる。これまでに取得した 69 物質に対して、我々が構築した遺伝子セットを用いた検出法は遺伝毒性肝発がん物質を、感度 83%、特異度 95%、正答率 90% の高い精度で検出できる可能性が示唆された。さらに、遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の検証で得られた肝組織を用いた DNA アダクトーム解析による評価を行った。線形判別分析により、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の 4 つのグループに分離されることが判明した。

研究分担者

横平政直	香川大学医学部 腫瘍病理学 准教授
豊田武士	国立医薬品食品衛生研究所病理部 室長
加藤寛之	名古屋市立大学 実験病態病理学 助教
鈴木周五	大阪市立大学 分子病理学 准教授
魏 民	大阪市立大学 環境リスク評価学 准教授
戸塚ゆ加里	国立がん研究センター研究所 ユニット長

A. 研究目的

化審法の規制区分「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」には、スクリーニング毒性試験の結果から健康影響の懸念を評価されているものの、慢性毒性や発がん性が不明の物質が多く存在する。しかし、それらの物質を全て長期試験により検討することは、莫大な費用や時間等を必要とするため困難である。そこで、化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に評価できる試験法および試験スキームの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、国民生活の安全・安心を保証する。

本研究では化学物質の標的となる臓器の大半は肝臓であることに着目し、肝発がん性を短期で高精度に検証できるシステムを確立するとともに、問題となる「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」について

発がん性評価を行う。平成29年度～令和元年度「化学物質の有害性評価の迅速化・高精度化・標準化に関する研究」（鰐淵班）で開発した「遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」及び「DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価」はいずれも正答率が9割を超える高精度試験系であるが、初年度から次年度に「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」を含め化学物質数を増やし、より信頼性の高い評価法へと発展させる。加えて「遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」のOECDテストガイドライン化を目指す。また、上記試験法で解決できない非遺伝毒性肝発がん物質に対する試験法確立を目指す。以前に非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせ「遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」を確立したが、その検出力を動物実験を行い検証する。初年度は既知の非遺伝毒性肝発がん物質を主体に、次年度以降は「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」を含め検証及び改良し、最終的にOECDテストガイドラインへ化を目指す。これら3つの試験法を基に、短期肝発がん性総合評価スキームの確立を目指す。

令和2年度は、非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法を確立するために用いた陽性対照化学物質3つを含む16化学物質について、ラット28日間反復投与試験を実施し、肝組織を採取、RNAを抽出・生成し、網羅的遺

伝子発現解析を行い、各化学物質について判定を行った(大阪市立大/鰐淵・鈴木、香川大/横平、国立衛研/豊田、名古屋市立大/加藤)。我々が構築した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性の検証では、「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」を含む6化学物質について、検討を行った(大阪市立大/鰐淵・魏)。さらに、DNAアダクトーム解析を用いて化学物質のDNA損傷を指標とした安全性評価法を確立するために、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルで得られた肝臓組織を用いて化学物質の投与に相関する付加体群について検討した(国立がん研究センター/戸塚、大阪市立大/鰐淵)。

B. 研究方法

1. 遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立(鰐淵、横平、豊田、加藤、鈴木)

OECD テストガイドラインの TG407:げっ歯類における28日間反復経口投与毒性試験を基に動物実験を行った。6週齢SD雄ラットに被験物質を28日間投与後に屠殺剖検を行い肝臓を採取した。今回は、優先評価化学物質を2物質含む、非遺伝毒性肝発がん物質11種および非発がん物質5種の合計16物質について検討した。発がん物質は、2年間のがん原性試験に用いられた投与量および経路で投与した。

大阪市立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質3種: Thioacetamide (TAA; 0.5 g/kg)、11-Aminoundecanoic acid (AUDA; 15 g/kg)、di(2-Ethylhexyl)phthalate (DEHP; 12 g/kg)と、非肝発がん物質1種: Quercetin dihydrate (QDH; 50 g/kg)を摂餌投与した。

香川大学担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質2種: Phenobarbital, sodium (PB; 500 mg/L)、1,4-Dioxane (1,4-D; 5 g/L)と、非肝発がん物質2種: Phytic acid (PhA; 2.5%)、Cyclohexanone (CHN; 6.5 g/L)を飲水投与した。

国立衛研担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質3種: Clofibrate (CFB; 5 g/kg)、Chlorendic acid (CRA; 1.25 g/kg)、Ponceau 3R (P3R; 50 g/kg)と、非肝発がん物質1種: Caprolactam (CPL; 7.5 g/kg)を摂餌投与した。

名古屋市立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質3種: Decabromodiphenyl oxide (DBDPO; 50 g/kg)、dl-Ethionine (DL-ET; 1 g/kg)、Doxylamine succinate (DOX; 2 g/kg)と、非肝発がん物質1種: Hexachlorophene (HCP; 150 mg/kg)を摂餌投与した。

肝臓からRNeasy mini kit(キアゲン)を用いてtotal RNAを抽出・精製し、GeneChip® Clariom D Assay, Rat (Rat Transcriptome Array 2.0)を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ごとの遺伝子発現変化データを取得した。

得られた遺伝子発現変化のうち、以前にGeneChip® Rat Genome 230 2.0 Arrayを使用して、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた106遺伝子セットから、共通の遺伝子として選出可能であった103遺伝子を用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出(サポートベクターマシーンによる

数理的アルゴリズムによるモデル)及び発がん機序に基づいた分類を行い、検出法の特異性及び感受性について検証した(現行予測モデル)。

また、新たな遺伝子セットを検討するため、以前と同様に細胞傷害(TAA, MP)や酵素誘導(PB, HCB)、PPAR α アゴニスト(CFB, WY)に属する化学物質2種において、共通して対照群との発現差がWelch T値が5以上となる遺伝子を選出した。次にそれぞれの属する化学物質において対照群との平均した発現差が4倍以上異なるとともに、42の非発がん物質で発現変動平均が0.5以下となる遺伝子を選出した。加えて、選出した遺伝子が、各所属化学物質の8割以上で変化するとともに、非発がん物質において2倍以上変化する物質が4つ以下となる遺伝子を選出した(新規予測モデル)。

2. 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立(鰐淵、魏)

6週齢の雄SDラットを8群に分け、被験物質を単回強制胃内投与試験を行った。被験物質に関する情報と投与濃度は表5に示す。判定対象物質として、優先評価化学物質1種(o-phenylenediamine(OPD))、監視対象化学物質1種(Disperse Blue 134(DB-134))を、既知の遺伝毒性肝発がん物質4種(Safrole; 2-Nitrofluorene(2-NF); 2-Aminoanthraquinone(2-AAQ); 1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone(ADBAQ))の合計6物質を用いた。また、溶媒対照群(対照群)として0.5% Methyl cellulose(MC)投与群、および陽性対照群として2-Nitropropane(2-NP)投与群を設けた。

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

遺伝子発現については、リアルタイムPCR(qPCR)にてデータを取得した。肝臓からのtotal RNA抽出とcDNAの合成はそれぞれRNeasy mini kit(キアゲン)とSuperScript VI VIL0 Maste Mix(invitrogen)を使用した。得られた遺伝子発現データを我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル(サポートベクターマシーンによる数理的アルゴリズムによるモデル)に入力し、判定を行った。

3. DNAアダクトーム解析による遺伝毒性評価(鰐淵、戸塚)

雄性SDラット(各群それぞれ5匹)に遺伝毒性肝発がん物質(2018年;9種、2019年;13種、計22種)、遺伝毒性非発がん物質(2018年;3種、2019年;3種、計5種)、非遺伝毒性肝発がん物質(2018年;2種、2019年;5種、計7種)、非遺伝毒性非肝発がん物質

(2018年; 16種、2019年; 8種、計24種)を投与24時間後に肝臓を摘出した。使用した化学物質は図1に示す。

2018年セット (計30化合物)	2019年セット (計28化合物)
<ul style="list-style-type: none"> 遺伝毒性ラット肝発がん物質 (+/+): 9種 o-Aminozotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 3-Methyl-4-dimethylaminoozobenzene (MDA), 4,4'-Thiodianiline (TDA), N-Nitrosodimethylamine (NDEA), N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), Nitrosodibutylamine (NB), N-Nitrosopyrrolidine (NWP) 遺伝毒性非ラット肝発がん物質 (+/+): 3種 Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT) 非遺伝毒性肝発がん物質 (+/+): 2種 Monocrotaline (MCT), Phenobarbital (PB) 非遺伝毒性非ラット肝発がん物質 (-/-): 16種 Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI), Indomethacin (IM), Phenybutazone (PBZ), Promethazine (PMZ), Sulindac (SUL), Tetracycline (TCL), Ethionamide (ETH), Theophylline (TEO), Caffeine (CAF), Chloramphenicol (CMP) 	<ul style="list-style-type: none"> 遺伝毒性ラット肝発がん物質 (+/+): 13種 4,4'-Oxydianiline (44-ODA), Auramine-O (AO), Acid Red 26 (C1-16150)(AR-26), Benzidine (BZ), Dichloroacetic Acid (DCA), Ethylene thiourea (ETU), Hydrazinium Sulfate (HS), Hydrazine (H2), 4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline)(MBOCA), Nitrosoheptamethyleneimine (NHMI), Retrorsine (RTS), Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP), Vinyl Bromide (VB) 遺伝毒性非ラット肝発がん物質 (+/+): 2種 2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene) (DNT), Isonicotinic Acid Hydrazide (INH) 非遺伝毒性肝発がん物質 (+/+): 5種 Carbon Tetrachloride (CCL4), Coumarin (Coumarin), Ethynylestradiol (EE), Gemfibrozil (GFZ), Hexachlorobenzene (HCB) 非遺伝毒性非ラット肝発がん物質 (-/-): 8種 Allyl alcohol (AA), Butylated hydroxyanisole (BHA), Chlorpheniramine (CHL), Chlorpropamide (CPP), Furosemide (FUR), Methyldopa (MDP), Methimazole (MTZ), Sulfasalazine (SS)

陽性対照 2-Nitropropane (2-NP) 陰性対照 Methyl cellulose (MC)

図1 使用した化学物質

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

次に、得られたデータから、対照群である2-NPおよびMCを除いたデータを用いた。実際に予測モデルを使用する場合は遺伝毒性/肝発がん性の情報がない化学物質に対して実施することを想定して、Leave-One-Out交差検証により予測結果の精度評価を行った。Leave-One-Out交差検証は、ある曝露物質のデータをテスト用とし、他の曝露物質のデータを用いて学習したモデルの精度を評価することを、物質を変えながら繰り返す検証方法であり、毒性が未知の物質に対する予測を模擬した精度評価方法である。この方法を用いて、遺伝毒性、肝発がん性、遺伝毒性/肝発がん性を付加体から予測するモデルを試作した。学習アルゴリズムとしては、ランダムフォレストを使用した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立(鱒淵、横平、豊田、加藤、鈴木)

各物質を4週間投与後に屠殺・剖検した際に、TAA、PBおよびPhAは、有意な体重増加抑制を認めた。特にPhAは毒性のため4週目に2匹死亡した。また、DL-ETも体重増加抑制傾向を認めたが、最終屠殺時には有意

な差は見られなかった。肝重量は、DEHP、CHN、CRA、P3R、CFBおよびDBDPO投与により、絶対および相対肝重量が有意に増加した。一方、PhAにおいては、絶対肝重量の低下を認めたが相対肝重量には変化を認めなかった。採取された肝組織について検討した結果、TAA、DEHP、PB、DBDPOにおいて肝細胞肥大や空胞変性などの変化を認めた。また、AUDA、CHN、CRA、P3R、CFBおよびDL-ETにおいても軽度ながら肝細胞肥大などの変化が存在した。

表1 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果

施設	投与物質	略名	投与量	発がん性	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	0.5g/kg diet	陽性	陽性	○
	di (2-Ethylhexyl)phthalate	DEHP	12g/kg diet	陽性	陽性	○
	11-Aminoundecanoic acid	AUDA	15g/kg diet	陽性	陰性	×
	Quercetin dihydrate	QDH	50g/kg diet	陰性	陰性	○
	1,4-Dioxane	1,4-D	5g/L drink	陽性	陰性	×
香川大学	Phenobarbital, sodium	PB	0.5g/L drink	陽性	陰性	×
	Phytic acid	PhA	25g/L drink	陰性	陰性	×
	Cyclohexanone	CHN	6.5g/L drink	陰性	陰性	○
	Chlorendic acid	CRA	1.25g/kg diet	陽性	陰性	×
国立衛研	Ponceau 3R	P3R	50g/kg diet	陽性	陰性	×
	Clofibrate	CFB	5g/kg diet	陽性	陽性	○
	Caprolactam	CPL	7.5g/kg diet	陰性	陰性	○
	Decabromodiphenyl oxide	DBDPO	50g/kg diet	陽性	陰性	×
名市大	dl-Ethionine	DL-ET	1g/kg diet	陽性	陰性	×
	Doxylamine succinate	DOX	2g/kg diet	陽性	陰性	×
	Hexachlorophene	HCP	0.15g/kg diet	陰性	陰性	○

マイクロアレイ解析により対照群との遺伝子発現変化を確認し、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた103遺伝子セットを用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出を行った。結果、11の非遺伝毒性肝発がん物質うち、TAA、DEHPおよびCFBについては、発がん物質と判定されたものの、他の8物質は陰性と判定された。一方、5つの非発がん物質はいずれも陰性と判定された(表1)。

予測モデルの作成時の結果、感度73%(11/15物質)、特異度100%(42/42)に今回の結果を加えると、感度54%(14/26)、特異度100%(47/47)で、正答率が84%(61/73)となった。遺伝子セットを用いた主成分解析では、陽性判定されたTAAは細胞障害に、DEHPおよびCFBはPPAR α アゴニストに属することが確認出来た(図2)。

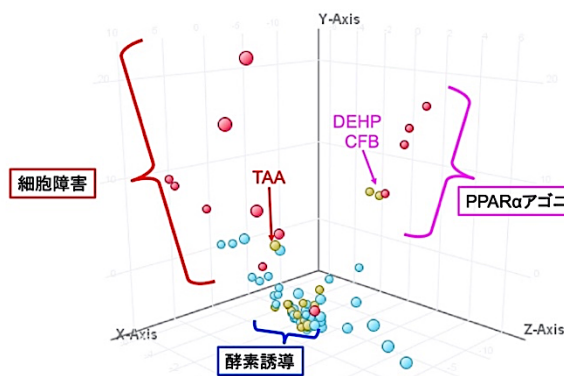


図2 遺伝子セットを用いた主成分解析

そこで、モデル解析に用いる遺伝子について再選定し、予測率の改善を試みた。細胞障害 (TAA, MP) から4 遺伝子、酵素誘導 (PB, HCB) から3 遺伝子、PPAR α アゴニスト (CFB, WY) から8 遺伝子が選出され、酵素誘導と PPAR α アゴニストに共通の遺伝子が1つ存在したことから、合計14 遺伝子からなるセットが作成された。その14 遺伝子を用いて、新規予測モデルを再作成して検討した結果、感度80%(12/15 物質)、特異度98%(41/42)が得られ、今回検討した新規化学物質においても感度45%(5/11 物質)、特異度100%(5/5)と改善された(表2)。これらの結果をまとめると、感度65%(17/26 物質)、特異度98%(46/47)で、正答率が86%(63/73)となった。

表2 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果 (新規予測モデル)

施設	投与物質	略名	投与量	発がん性	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	0.5g/kg diet	陽性	陽性	○
	di(2-Ethylhexyl)phthalate	DEHP	12g/kg diet	陽性	陽性	○
	11-Aminoundecanoic acid	AUDA	15g/kg diet	陽性	陰性	×
	Quercetin dihydrate	QDH	50g/kg diet	陰性	陰性	○
香川大学	1,4-Dioxane	1,4-D	5g/L drink	陽性	陰性	×
	Phenobarbital, sodium	PB	0.5g/L drink	陽性	陽性	○
	Phytic acid	PhA	25g/L drink	陰性	陰性	×
	Cyclohexanone	CHN	6.5g/L drink	陰性	陰性	○
国立衛研	Chlorendic acid	CRA	1.25g/kg diet	陽性	陽性	○
	Ponceau 3R	P3R	50g/kg diet	陽性	陰性	×
	Clofibrate	CFB	5g/kg diet	陽性	陽性	○
	Caprolactam	CPL	7.5g/kg diet	陰性	陰性	○
名市大	Decabromodiphenyl oxide	DBDPO	50g/kg diet	陽性	陰性	×
	dl-Ethionine	DL-ET	1g/kg diet	陽性	陰性	×
	Doxylamine succinate	DOX	2g/kg diet	陽性	陰性	×
	Hexachlorophene	HCP	0.15g/kg diet	陰性	陰性	○

2. 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立 (鰐淵、魏)

2-NP (陽性対照群) で1例が死亡した。2-NP、2-NF 群および2-AAQ 群で対照群に比較して有意な体重増加抑制が認められた。また、2-NP および OPD 群で、絶対肝重量および相対肝重量の有意な減少が認められた。DB-134 群では、相対肝重量の有意な減少が認められたが、絶対肝重量に有意な変化はみられなかった。同群では体重が増加傾向を示したことから、相対肝重量の減少は体重増加に伴ったものである可能性が示唆された。2-AAQ 群で絶対肝重量の有意な減少が認められたが、相対肝重量に有意な変化はみられなかった。これには同群での体重減少が関連する可能性があると考えられた。

病理組織学的には、2-NP 群および Safrole 群で肝細胞壊死および脂肪変性が認められた。2-NF 群では小葉中心性両染色性変化が見られた。OPD 群、DB-134 群、ADBAQ 群では明らかな病理学的変化はみられなかった。

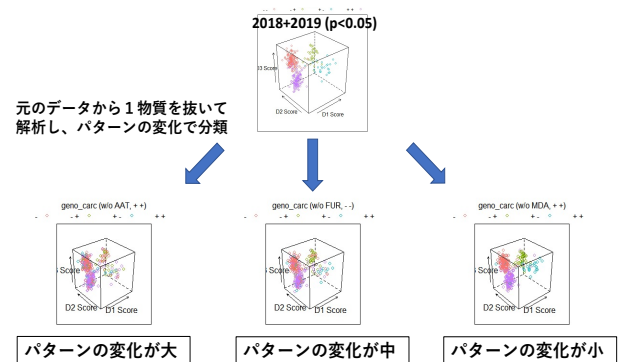
qPCR で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った(表3)。本モデルでは、遺伝毒性ラット肝発がん物質を「陽性」、その他の物質を「陰性」と判定する。その結果、「陽性」と判定されたものは、遺伝毒性肝発がん物質である2物質(2-NF, 2-AAQ)であった。しかし、それ以外の3遺伝毒性肝物質は「陰性」と判定された。遺伝毒性陽性で発がん性不明であるDB-134は「陰性」と判定された。

表3 遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性の検証結果

投与物質	分類	LD50 (mg/kg)	投与量 (mg/kg)	判定	正否
0.5% Methyl cellulose (MC)	溶媒 (陰性対照物質)				
2-Nitropropane (2-NP)	遺伝毒性陽性肝発がん物質 (陽性対照物質)	720	240#	陽性	○
o-phenylenediamine (OPD) 優先評価化学物質	遺伝毒性陽性肝発がん物質	510	170#	陰性	×
Disperse Blue 134 (DB-134) 監視対象化学物質	遺伝毒性陽性「発がん性不明」	「不明」	1000*	陰性	
Safrole	遺伝毒性陽性肝発がん物質	1950	650#	陰性	×
2-Nitrofluorene (2-NF)	遺伝毒性陽性肝発がん物質	「不明」	1000*	陽性	○
2-Aminoanthraquinone (2-AAQ)	遺伝毒性陽性肝発がん物質	>3200	1000*	陽性	○
1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ)	遺伝毒性陽性肝発がん物質	「不明」	1000*	陰性	×

LD50の1/3に相当する用量。

*入手可能な情報に参考にして、1日単回投与試験での致死量は1000 mg/kgより低い可能性が高いと推定した。



被験物質	パターン変化		
	大きい	中程度	小さい
2018年度曝露物質	9	2	19
2019年度曝露物質	14	7	7
計	23	9	26

- 2018年度は「変化が小さい」ものが多いと、2019年度は「変化が大きい」ものが多いことがわかった。
- 言い換えると2018年度に使用した被験物質は互いに類似した特徴を持っており、2019年度は互いに異なる特徴をもつ物質によって構成されていることが示唆される。
- 2018データと2019データの正答率の違いは、このような被験物質のもつ特徴に起因する可能性が考えられた。

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

3. DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価 (鰐淵、戸塚)

各種化学物質を投与したラット肝臓DNAのアダクトーム解析を行なった結果を図2に示す。LDA解析を行なったところ、2018データセット単独、2019データセット単独、及び2018+2019データセットのいずれにおいても、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに綺麗に分離されることがわかった(図3)。

2018+2019統合データセットから1被験物質を除いてLDA解析を行ない、そのパターンの変化の大・中・小で分類を行なってみたところ、2019年に試験した被験物質に変化の大きなものが多数存在することがわかった(図4)。

Leave-One-Out交差検証により化学物質の遺伝毒性/発がん性を予測するモデルを機械学習手法(ランダムフォレストを使用)を用いて試作した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いて2018+2019統合データセットに対して予測を行ったところ、遺伝毒性/肝発がん性の予測結果は49%、遺伝毒性の予測結果が50%、肝発がん性の予測結果は65%と2018年データセット単独の結

果と比べ正答率が低くなった（表4）。これは2019年データセットでの正答率が極端に低いことが大きく影響していると考えられた。

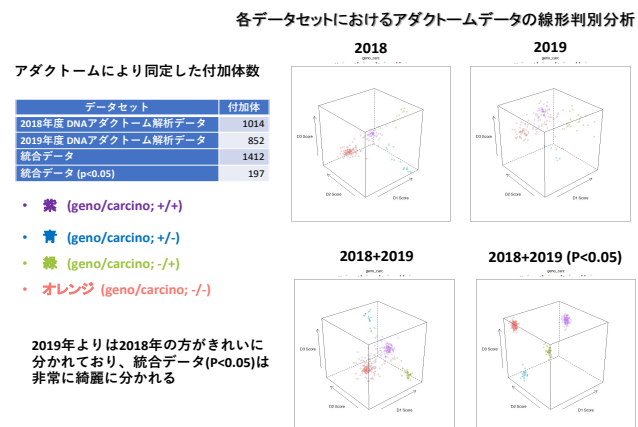


図4 2018+2019統合データセットから1被験物質を除いたLDA解析

表4 遺伝毒性の予測結果の比較

データセット	Geno/Carcino 正解率 (%)	Geno 正解率 (%)	Carcino 正解率 (%)
2018	88	88	94
2019	38	41	60
2018+2019	49	50	65

D. 考察

今回の非遺伝毒性肝発がん物質の検出法開発に用いた化学物質は、2年間のがん原性試験で用いた投与量を用いて検討した。PhAについては文献的に用いられている濃度を用いたものの、体重増加抑制傾向強く4週間投与時に死亡症例も出たことから、より低い濃度での投与が望まれる。一方で、陽性対照群として用意したPB投与群では、がん原性試験で用いた投与濃度 0.5 g/L 飲水投与では、一日体重あたり平均 43.3 mg/kg しか投与されておらず、強制胃内投与で行われたトキシコゲノミクスプロジェクトで発がん性として扱った 100 mg/kg に比べ半分以下と低いため、判定が陰性となった。

新規に検討した化学物質において、特異度は100%と高かったものの、感度は27%と低い結果となった。以前より、特異度に対して感度がやや低い傾向があり、今回の結果はその傾向が強く反映した結果となった。以前の成果と合わせて、特異度 100%(47/47)で、正答率は84%(61/73)と高いものの、感度 54%(14/26)については、改善が必要である。

その改善策として、遺伝子選定方法を変更した結果、今回検討した新規化学物質において、感度 45%(5/11 物質)、特異度 100%(5/5)と改善された。既存の化学物質の判定についても、特異度 98%(41/42)はわずかに低下したものの、感度 80%(12/15 物質)と以前よりも感度が高い検出法が確立された。これらの結果をまとめると、感度 65%(17/26 物質)、特異度 98%(46/47)で、正答率が86%(63/73)となった。今後は、本年度に判定が異なった物質の、投与濃度や投与方法の改善や、遺伝子選定を含めた予測モデルの改善を検討する予定である。

我々が構築した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の有用性の検証では、「優先評価化

学物質」OPD を含めたそれ以外の3遺伝毒性肝発がん物質は「陰性」と判定された。遺伝毒性陽性で発がん性不明の「監視化学物質」DB-134は「陰性」と判定された。今後、検出精度を確認するに、偽陰性物質については投与量を増やして再評価する必要がある。これまでに検討した69物質に対して、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度83%(24/29)、特異度95%(38/40)正答率90%(62/69)の高い精度で検出できる可能性が示唆された。なお、これまでに2-NF、DB-134及びADBAQのラットにおける経口LD50に関する報告はなかったが、本試験では、いずれの投与群においても死亡例がみられなかったことから、これらの物質のLD50は1000 mg/kg以上であることが明らかになった。GSH分類においては経口急性毒性区分4以上に該当することが示唆された。

HRAM-アダクトームを用いてDNA付加体の網羅解析を行ないLDA解析を行った結果、遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質の4つのグループに分離できた。

これらデータを用いてLeave-One-Out交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、50~65%の正答率となり、2018データセットを単独で用いた場合(88~94%)と比較して精度が低下することがわかった。この結果は、2019年データセット単独での低い正答率が影響していると推測された。2018+2019統合データセットから1被験物質を除いてLDA解析を行ない、そのパターンの変化の大・中・小で分類を行なってみたところ、2019年に試験した被験物質に変化の大きなものが多数存在することがわかった。このことは、2018年度に使用した被験物質は互いに類似した特徴を持っており、2019年度は互いに異なる特徴をもつ物質によって構成されていることが示唆される。2018データと2019データの正答率の違いは、このような被験物質のもつ特徴に起因する可能性が考えられた。今後は、2018+2019統合データセットの正答率向上について更に検討を行う。また、各グループの予測に重要な付加体の探索やアダクトームデータに化学物質構造データを追加するなど予測精度の向上についても検討する。

E. 結論

我々が構築した遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法は、非遺伝毒性肝発がん物質を高い精度で検出できる可能性が示唆された。施設間で共通の試験法を行う事で、標準化された試験法確立を目指すとともに、今後も本検出法の限界についての検証を引き続き行う必要がある。

我々が遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法は、遺伝毒性肝発がん物質を高い精度で検出できる可能性が示唆された。今後も本検出法の限界についての検証を引き続き行う必要がある。

DNA アダクトーム解析を用いて化学物質のDNA損傷を指標とした化学物質の肝発がん性・遺伝毒性への分類、遺伝毒性および肝発がん性の予測が可能となる結果を示した。予測精度については化学物質数を増やし

た際に低下しており、より改善したモデル構築を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 2021; 336: 32-8.
- 2) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2021; 13.
- 3) Mori T, Tanaka H, Suzuki S, Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2021; 112: 1746-57.
- 4) Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, Kato H, Naiki-Ito A, Watanabe K, Nagayasu Y, Hosokawa Y, Takiguchi S, Kasugai K, Kasai K, Inaguma S, Takahashi S. PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients. *Virchows Arch.* 2021. (In press; DOI: 10.1007/s00428-021-03062-0)
- 5) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Cho YM, Akagi JI, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K. Expression of stem cell markers as useful complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for gamma-H2AX. *Arch Toxicol.* 2021; 95: 715-26.
- 6) Yamada T, Toyoda T, Ide T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Neuromuscular and vascular hamartoma of the small intestine in an F344 rat. *J Toxicol Pathol.* 2021; 34: 113-7.
- 7) Tsuda H, Yoshida M, Akiyama F, Ohi Y, Kinowaki K, Kumaki N, Kondo Y, Saito A, Sasaki E, Nishimura R, Fujii S, Homma K, Horii R, Murata Y, Itami M, Kajita S, Kato H, Kurosumi M, Sakatani T, Shimizu S, Taniguchi K, Tamiya S, Nakamura H, Kanbayashi C, Shien T, Iwata H. Nuclear grade and comedo necrosis of ductal carcinoma in situ as histopathological eligible criteria for the Japan Clinical Oncology Group 1505 trial: an interobserver agreement study. *Jpn J Clin Oncol.* 2021; 51: 434-43.
- 8) Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.* 2021; 112: 7-15.
- 9) Matsuyama N, Naiki T, Naiki-Ito A, Chaya R, Kawai T, Etani T, Nagai T, Kato H, Kubota Y, Yasui T. Novel case of androgen receptor-positive cancer of unknown primary without serum prostate-specific antigen elevation that became progression free in the long term after primary combined androgen blockade. *IJU Case Rep.* 2021; 4: 59-63.
- 10) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Specific expression of survivin, SOX9, and CD44 in renal tubules in adaptive and maladaptive repair processes after acute kidney injury in rats. *Journal of applied toxicology.* 2021; 41: 607-17.
- 11) 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 FG, Bernabe KG, 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.* 2021; 555: 71-7.
- 12) Kato H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* 2021. (In press; DOI: 10.1093/carcin/bgab017)
- 13) Nishikawa S, Uemoto Y, Kim TS, Hisada T, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Dong Y, Sugiura H, Okuda K, Kato H, Osaga S, Takahashi S, Toyama T. Low RAI2 expression is a marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2021; 187: 81-93.
- 14) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, 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.* 2020; 96: 180-7.
- 15) Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani T. Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-

- resistant bladder cancer. *Cancer Lett.* 2020; 479: 89–99.
- 16) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279–85.
 - 17) Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the association with prognosis and treatment. *PLoS One.* 2020; 15: e0238120.
 - 18) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21.
 - 19) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 927–37.
 - 20) Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Matsuda Y, Imaida K. Lung proliferative lesion-promoting effects of left pulmonary ligation in A/J female mice. *Pathol Int.* 2020; 70: 340–7.
 - 21) Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 2020; 12.
 - 22) Uemoto Y, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Asano T, Hisada T, Nishikawa S, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Okuda K, Sugiura H, Kato H, Takahashi S, Toyama T. Sentinel lymph node biopsy may be unnecessary for ductal carcinoma in situ of the breast that is small and diagnosed by preoperative biopsy. *Jpn J Clin Oncol.* 2020; 50: 1364–9.
 - 23) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. *Toxicology.* 2020; 429: 152325.
 - 24) Nozaki S, Naiki T, Naiki-Ito A, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T. Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis. *Andrology.* 2020; 8: 1895–906.
 - 25) Nakano-Narusawa Y, Yokohira M, Yamakawa K, Saoo K, Imaida K, Matsuda Y. Single Intratracheal Quartz Instillation Induced Chronic Inflammation and Tumourigenesis in Rat Lungs. *Sci Rep.* 2020; 10: 6647.
 - 26) Nakanishi H, Sawada T, Kaizaki Y, Ota R, Suzuki H, Yamamoto E, Aoki H, Eizuka M, Hasatani K, Takahashi N, Inagaki S, Ebi M, Kato H, Kubota E, Kataoka H, Takahashi S, Tokino T, Minamoto T, Sugai T, Sasaki Y. Significance of gene mutations in the Wnt signaling pathway in traditional serrated adenomas of the colon and rectum. *PLoS One.* 2020; 15: e0229262.
 - 27) Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2020; 41: 1145–57.
 - 28) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 4085–97.
 - 29) 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.* 2020; 41: 368–76.
 - 30) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 2020; 25.
 - 31) Kishi S, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Kanie S, Hashimoto N, Saoo K, Yokohira M, Imaida K, Matsuda Y. Preexisting diabetes mellitus had no effect on the no-observed-adverse-effect-level of acetaminophen in rats. *J Toxicol Sci.* 2020; 45: 151–62.

- 32) 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.* 2020; 42: 16.
- 33) Kato T, Matsuo Y, Ueda G, Aoyama Y, Omi K, Hayashi Y, Imafuji H, Saito K, Tsuboi K, Morimoto M, Ogawa R, Takahashi H, Kato H, Yoshida M, Naitoh I, Hayashi K, Takahashi S, Takiguchi S. Epithelial cyst arising in an intrapancreatic accessory spleen: a case report of robotic surgery and review of minimally invasive treatment. *BMC Surg.* 2020; 20: 263.
- 34) Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Toyama T, Takahashi S. The standard form of CD44 as a marker for invasion of encapsulated papillary carcinoma of the breast. *Pathol Int.* 2020; 70: 835-43.
- 35) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagai T, Etani T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway. *Cancer Sci.* 2020; 111: 1165-79.
2. 学会発表
- 1) 鰐淵英機、魏民。職業曝露によるがん発生の要因解明と予防研究への展開。第 27 回がん予防学会総会。Web 開催 (2020 年 9 月)
- 2) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智。NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果。第 109 回日本病理学会総会、Web 開催 (2020 年 8 月)
- 3) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智。ラット膀胱尿路上皮のニコチンによる増殖は NADPH oxidase 阻害剤 apocynin により抑制される。第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020 年 10 月)
- 4) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機。芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明。第 93 回産業衛生学会、Web 開催 (2020 年 4 月)
- 5) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機。ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用。第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催 (2020 年 6 月)
- 6) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020 年 10 月)
- 7) 梯アンナ、鈴木周五、魏民、鰐淵英機。NASH 肝発がんにおける特異的候補分子および新規マーカーとして CACHD1 の役割。第 79 回日本癌学会学術総会、広島県、Web 開催 (2020 年 10 月)
- 8) 鰐淵英機。日本毒性病理学会のグローバル戦略。第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- 9) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智。NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果。第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- 10) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機。化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出。第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- 11) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機。マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2 の解明。第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- 12) 豊田武士、松下幸平、山田貴宣、赤木純一、森川朋美、小川久美子。腎発がん物質早期検出指標としての γ -H2AX の応用可能性: 用量相関性の検討。第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催、(2021 年 1 月)
- 13) 豊田武士、小川久美子。ラット膀胱粘膜における γ -H2AX 形成を指標とした芳香族アミンの膀胱傷害性および発がん性評価。第 79 回日本癌学会学術総会、広島県、(2020 年 10 月)
- 14) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子。オルト-トルイジン類似構造を持つ芳香族アミンによるラット膀胱傷害および遺伝子発現解析。第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催、(2020 年 6 月)
- 15) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、井手鉄哉、小川久美子。ラット肝臓標本を用いた肝発がん物質早期検出のためのバイオマーカーの探索。第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催、(2021 年 1 月)
- 16) 山田貴宣、原田賢吾、豊田武士、小川久美子、中山千里、田川義章、奥山学。SD ラットに認められた真正半陰陽の一例。第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催、(2021 年 1 月)
- 17) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子。急性腎障害から慢性腎臓病への進展における CD44 の役割。第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催、(2021 年 1 月)
- 18) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、靄島由二。RNA アプタマーを利用した組織再生を促進する新規機能性医用材料の創製に関する研究。第 58 回日本人工臓器学会大会、高知県、(2020 年 11 月)
- 19) 赤木純一、豊田武士、小川久美子。肝発がん物質投与ラット肝細胞における γ -H2AX 誘導と細胞増殖活性の相関。第 79 回日本癌学会学術総会、広島県、(2020 年 10 月)
- 20) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子。腎虚血再灌流障害モデルラットを用いた急性腎障害から慢性腎臓病への進展メカニズムの解明。第 163 回日本獣医学会学術集会、Web 開催、

(2020年9月)

- 21) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子.mRNA-microRNA 統合解析を用いた腎代償性メカニズムの包括的解析. 第47回日本毒性学会学術年会、Web開催、(2020年6月)
- 22) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、高橋智. エラグ酸の膵発癌抑制効果と膵癌におけるレジスチンの効果の検討. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、浜松(2021年1月)
- 23) Kato H, Naiki-Ito A, Komura M, Inaguma S, Takahashi S. Ellagic acid prevents pancreatic carcinogenesis in hamster model. The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Hiroshima (2020.10)
- 24) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、山下依子、稲熊真悟、高橋 智. Luteolin は STAT3 経路と DPD 発現を低下させ膵発癌を抑制する. 第109回日本病理学会総会、福岡(2020年4月)
- 25) 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)
- 26) 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)
- 27) 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)
- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) 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、Web開催)
- 31) 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、Web開催)

G. 知的所有権の取得状況

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和2年度分担研究報告書

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
(20KD0101)

分担研究項目：遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立

研究分担者 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学 教授

研究要旨

本研究は、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせ「遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」の有用性を検証する。本年度は、非遺伝毒性肝発がん物質 11 種類と、非発がん物質 5 種類の合計 16 種について検討した。OECD テストガイドラインの TG407：げっ歯類における 28 日間反復経口投与毒性試験を基に動物実験を行った。採取した肝組織から RNA を抽出、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法を用いて、それぞれの物質の発がん性検出を行った。今回検討した新規化学物質において感度 27%(3/11 物質)、特異度 100%(5/5)と判定され、以前のデータと合わせて感度 54%、特異度 100%および正答率が 84%となった。そこで、新たな遺伝子セットを作成および検討した結果、新規化学物質において感度 45%(5/11 物質)、特異度 100%(5/5)と改善され、以前の試験データによる解析と合わせて、感度 65%、特異度 98%、正答率が 86%となる遺伝子セットが確立でき、非遺伝毒性肝発がん物質の検出法として有用であることを示した。

A. 研究目的

化審法の規制区分「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」には、スクリーニング毒性試験の結果から健康影響の懸念を評価されているものの、慢性毒性や発がん性が不明の物質が多く存在する。しかし、それらの物質を全て長期試験により検討することは、莫大な費用や時間等を必要とするため困難である。そこで、化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に評価できる試験法および試験スキームの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、国民生活の安全・安心を保証する。

本研究では化学物質の標的となる臓器の大半は肝臓であることに着目し、肝発がん性を短期で高精度に検証できるシステムを確立するとともに、問題となる「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」について発がん性評価を行う。平成29年度～令和元年度「化学物質の有害性評価の迅速化・高精度化・標準化に関する研究」（鰐淵班）で開発した「遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」では、解決できない非遺伝毒性肝発がん物質に対する試験法確立を目指す。

非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせ「遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」を確立したが、その検出力を動物実験を行い検証する。令和2年度は既知の非遺伝毒性肝発がん物質を主体に、その検出法の有用性を検証する。

B. 研究方法

OECD テストガイドラインの TG407：げっ歯類における 28 日間反復経口投与毒性試験を基に動物実験を行

った。6 週齢 SD 雄ラットに被験物質を 28 日間投与後に屠殺剖検を行い肝臓を採取した。肝臓から RNeasy mini kit（キアゲン）を用いて total RNA を抽出・精製し、GeneChip® Clariom D Assay, Rat (Rat Transcriptome Array 2.0)を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ごとの遺伝子発現変化データを取得した。

得られた遺伝子発現変化のうち、以前に GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array を使用して、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた 106 遺伝子セットから、共通の遺伝子として選出可能であった 103 遺伝子を用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出（サポートベクターマシーンによる数理的アルゴリズムによるモデル）及び発がん機序に基づいた分類を行い、検出法の特異性及び感受性について検証した（現行予測モデル）。

また、新たな遺伝子セットを検討するため、以前と同様に細胞傷害（TAA、MP）や酵素誘導（PB、HCB）、PPAR α アゴニスト（CFB、WY）に属する化学物質 2 種において、共通して対照群との発現差が Welch T 値が 5 以上となる遺伝子を選出した。次にそれぞれの属する化学物質において対照群との平均した発現差が 4 倍以上異なるとともに、42 の非発がん物質で発現変動平均が 0.5 以下となる遺伝子を選出した。加えて、選出した遺伝子が、各所属化学物質の 8 割以上で変化するとともに、非発がん物質において 2 倍以上変化する物質が 4 つ以下となる遺伝子を選出した（新規予測モデル）。

非遺伝毒性肝発がん物質 11 種として、Thioacetamide (TAA)、11-Aminoundecanoic acid (AUDA)、di(2-Ethylhexyl)phthalate (DEHP)、Phenobarbital、sodium

(PB)、1,4-Dioxane (1,4-D)、Clofibrate (CFB)、Chlorendic acid (CRA)、Ponceau 3R (P3R)、Decabromodiphenyl oxide (DBDPO)、dl-Ethionine (DL-ET)、Doxylamine succinate (DOX) と、非肝発がん物質 5 種: Quercetin dihydrate (QDH)、Phytic acid (PhA)、Cyclohexanone (CHN)、Caprolactam (CPL)、Hexachlorophene (HCP) を用いた。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

マイクロアレイ解析により対照群との遺伝子発現変化を確認し、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた 103 遺伝子セットを用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出を行った。結果、11 の非遺伝毒性肝発がん物質うち、TAA、DEHP および CFB については、発がん物質と判定されたものの、他の 8 物質は陰性と判定された。一方、5 つの非発がん物質はいずれも陰性と判定された (表 1)。

予測モデルの作成時の結果、感度 73% (11/15 物質)、特異度 100% (42/42) に今回の結果を加えると、感度 54% (14/26)、特異度 100% (47/47) で、正答率が 84% (61/73) となった。遺伝子セットを用いた主成分解析では、陽性判定された TAA は細胞障害に、DEHP および CFB は PPAR α アゴニストに属することが確認出来た (図 1)。

表 1. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果 (現行予測モデル)

施設	投与物質	略名	投与量	発がん性	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	0.5g/kg diet	陽性	陽性	○
	di (2-Ethylhexyl)phthalate	DEHP	12g/kg diet	陽性	陽性	○
	11-Aminoundecanoic acid	AUDA	15g/kg diet	陽性	陰性	×
	Quercetin dihydrate	QDH	50g/kg diet	陰性	陰性	○
香川大学	1,4-Dioxane	1,4-D	5g/L drink	陽性	陰性	×
	Phenobarbital, sodium	PB	0.5g/L drink	陽性	陰性	×
	Phytic acid	PhA	25g/L drink	陰性	陰性	×
	Cyclohexanone	CHN	6.5g/L drink	陰性	陰性	○
国立衛研	Chlorendic acid	CRA	1.25g/kg diet	陽性	陰性	×
	Ponceau 3R	P3R	50g/kg diet	陽性	陰性	×
	Clofibrate	CFB	5g/kg diet	陽性	陽性	○
	Caprolactam	CPL	7.5g/kg diet	陰性	陰性	○
名市大	Decabromodiphenyl oxide	DBDPO	50g/kg diet	陽性	陰性	×
	dl-Ethionine	DL-ET	1g/kg diet	陽性	陰性	×
	Doxylamine succinate	DOX	2g/kg diet	陽性	陰性	×
	Hexachlorophene	HCP	0.15g/kg diet	陰性	陰性	○

そこで、モデル解析に用いる遺伝子について再選定し、予測率の改善を試みた。細胞障害 (TAA, MP) から 4 遺伝子、酵素誘導 (PB, HCB) から 3 遺伝子、PPAR α アゴニスト (CFB, WY) から 8 遺伝子が選出され、酵素誘導と PPAR α アゴニストに共通の遺伝子が 1 つ存在したことから、合計 14 遺伝子からなるセットが作成された。その 14 遺伝子を用いて、新規予測モデルを再作成して検討した結果、感度 80% (12/15 物質)、特異度 98% (41/42) が得られ、今回検討した新規化学物質においても感度 45% (5/11 物質)、特異度 100% (5/5) と改善さ

れた (表 2)。これらの結果をまとめると、感度 65% (17/26 物質)、特異度 98% (46/47) で、正答率が 86% (63/73) となった。

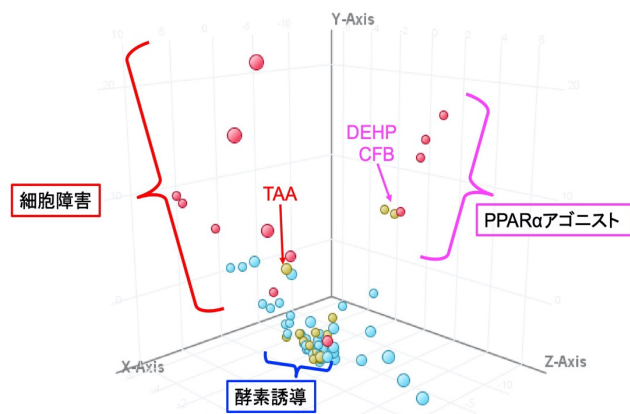


図 1. 遺伝子セットを用いた主成分解析

表 2. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果 (新規予測モデル)

施設	投与物質	略名	投与量	発がん性	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	0.5g/kg diet	陽性	陽性	○
	di (2-Ethylhexyl)phthalate	DEHP	12g/kg diet	陽性	陽性	○
	11-Aminoundecanoic acid	AUDA	15g/kg diet	陽性	陰性	×
	Quercetin dihydrate	QDH	50g/kg diet	陰性	陰性	○
香川大学	1,4-Dioxane	1,4-D	5g/L drink	陽性	陰性	×
	Phenobarbital, sodium	PB	0.5g/L drink	陽性	陽性	○
	Phytic acid	PhA	25g/L drink	陰性	陰性	×
	Cyclohexanone	CHN	6.5g/L drink	陰性	陰性	○
国立衛研	Chlorendic acid	CRA	1.25g/kg diet	陽性	陽性	○
	Ponceau 3R	P3R	50g/kg diet	陽性	陰性	×
	Clofibrate	CFB	5g/kg diet	陽性	陽性	○
	Caprolactam	CPL	7.5g/kg diet	陰性	陰性	○
名市大	Decabromodiphenyl oxide	DBDPO	50g/kg diet	陽性	陰性	×
	dl-Ethionine	DL-ET	1g/kg diet	陽性	陰性	×
	Doxylamine succinate	DOX	2g/kg diet	陽性	陰性	×
	Hexachlorophene	HCP	0.15g/kg diet	陰性	陰性	○

D. 考察

今回、新規に検討した化学物質において、特異度は高かったものの、感度は低い結果となった。以前より、特異度に対して感度がやや低い傾向があり、今回の結果はその傾向が強く反映した結果となった。その改善策として、遺伝子選定方法を変更した結果、特異度がやや低下したものの、感度が高い検出法が確立された。

今後も、より正答率の高い検出法を確立するため、遺伝子選定や方法について検討予定である。

E. 結論

化審法で実施される 28 日間反復投与試験において抽出した肝臓から得られた RNA を用いた遺伝子セットによる肝発がん性予測モデルは、感度 65%、特異度 98%、正答率 86% であり、非遺伝毒性肝発がん物質の検出法として有用であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi

- H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 2021; 336: 32-8.
- 2) Mori T, Tanaka H, Suzuki S, Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2021; 112: 1746-57.
 - 3) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 1216.
 - 4) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, 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.* 2020; 96: 180-7.
 - 5) Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani T. Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-resistant bladder cancer. *Cancer Lett.* 2020; 479: 89-99.
 - 6) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
 - 7) Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the association with prognosis and treatment. *PLoS One.* 2020; 15: e0238120.
 - 8) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 7746.
 - 9) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 927-37.
2. 学会発表
 - 1) 鰐淵英機、魏民. 職業曝露によるがん発生の要因解明と予防研究への展開. 第 27 回がん予防学会総会. Web 開催 (2020 年 9 月)
 - 2) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase阻害剤apocyninによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第109回日本病理学会総会、Web開催 (2020年8月)
 - 3) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. ラット膀胱尿路上皮のニコチンによる増殖はNADPH oxidase阻害剤apocyninにより抑制される. 第79回日本癌学会学術総会、Web開催 (2020年10月)
 - 4) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明. 第 93 回産業衛生学会、Web 開催 (2020 年 4 月)
 - 5) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催 (2020 年 6 月)
 - 6) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020 年 10 月)
 - 7) 鰐淵英機. 日本毒性病理学会のグローバル戦略. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
 - 8) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
 - 9) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
 - 10) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2 の解明. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- 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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和2年度分担研究報告書

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
(20KD0101)

分担研究項目：遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立

研究分担者 鈴木 周五 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学 准教授

研究要旨

本研究は、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせ「遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」の有用性を検証する。本年度は、陽性対照物質であるThioacetamideとともに、非遺伝毒性肝発がん物質3種と、非発がん物質1種類を、OECDテストガイドラインのTG407：げっ歯類における28日間反復経口投与毒性試験を基に動物実験を行った。採取した肝組織からRNAを抽出、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法を用いて、それぞれの物質の発がん性検出を行った。結果、Thioacetamideを含む2物質については発がん物質と判定し、非発がん物質1種類は非発がん物質と判定された。しかしながら1物質は、発がん物質ながら非発がん物質と判定された。以上の結果から、化審法で実施される28日間反復投与試験において摘出した肝臓から得られたRNAを用いた遺伝子セットによる肝発がん性予測モデルは、非遺伝毒性肝発がん物質の検出法として有用であることを示した。

A. 研究目的

化審法の規制区分「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」には、スクリーニング毒性試験の結果から健康影響の懸念を評価されているものの、慢性毒性や発がん性が不明の物質が多く存在する。しかし、それらの物質を全て長期試験により検討することは、莫大な費用や時間等を必要とするため困難である。そこで、化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に評価できる試験法および試験スキームの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、国民生活の安全・安心を保証する。

本研究では化学物質の標的となる臓器の大半は肝臓であることに着目し、肝発がん性を短期で高精度に検証できるシステムを確立するとともに、問題となる「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」について発がん性評価を行う。平成29年度～令和元年度「化学物質の有害性評価の迅速化・高精度化・標準化に関する研究」（鱒淵班）で開発した「遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」では、解決できない非遺伝毒性肝発がん物質に対する試験法確立を目指す。

非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせ「遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」を確立したが、その検出力を動物実験を行い検証する。令和2年度は既知の非遺伝毒性肝発がん物質を主体に、その検出法の有用性を検証する。

B. 研究方法

OECDテストガイドラインのTG407：げっ歯類における28日間反復経口投与毒性試験を基に動物実験を行った。6週齢SD雄ラットに被験物質を28日間投与後

に屠殺剖検を行い肝臓を採取した。肝臓からRNeasy mini kit（キアゲン）を用いてtotal RNAを抽出・精製し、microarrayを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ごとの遺伝子発現変化データを取得した。得られた遺伝子発現変化のうち、以前に非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた106遺伝子セットを用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出（サポートベクターマシーンによる数理的アルゴリズムによるモデル）及び発がん機序に基づいた分類を行い、検出法の特異性及び感受性について検証した。

大阪市立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質3種：Thioacetamide（TAA；0.5 g/kg）、11-Aminoundecanoic acid（AUDA；15 g/kg）、di(2-Ethylhexyl)phthalate（DEHP；12 g/kg）と、非肝発がん物質1種：Quercetin dihydrate（QDH；50 g/kg）を摂餌投与した。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

実験経過中にTAA投与群において、対照群に比べ摂餌量が少なく体重増加抑制傾向が見られ、最終屠殺時には対照群に比べ有意な体重減少を認めた（表1）。また、DEHP投与群においては肝臓の絶対および相対重量いずれも対照群に比べ有意な増加を認めた（表1）。一方、AUDA群やQDH群において、体重や肝重量、摂餌・飲水量に対照群との差は見られなかった（表1）。

表1. 体重および肝重量、摂餌・飲水量

Treatment	Rat No	No. of rat	Body weight (g)	Liver		Food consumption	Water consumption
				Absolute (g)	Relative (%)		
Control	101-104	4	414.6 ± 48.1	16.6 ± 3.3	4.0 ± 0.4	23.4 ± 1.4	36.8 ± 2.5
TAA	201-204	4	291.5 ± 11.4 ***	13.5 ± 1.2	4.6 ± 0.3	16.5 ± 2.2	32.9 ± 1.8
AUDA	301-304	4	401.1 ± 18.6	16.4 ± 1.6	4.1 ± 0.3	23.3 ± 1.2	39.8 ± 3.1
DEHP	401-404	4	388.8 ± 34.5	22.7 ± 3.9*	5.8 ± 0.6***	24.1 ± 1.8	38.5 ± 3.1
QDH	501-504	4	416.6 ± 32.1	16.5 ± 0.7	4.0 ± 0.3	23.8 ± 1.0	34.6 ± 1.4

*, ***, P < 0.05 and 0.001 vs Control, respectively
TAA: thiocetamide; AUDA: 11-aminoundecanoic acid; DEHP: di(2-ethylhexyl)phthalate; QDH: quercetin dihydrate

肝臓の組織学的検討した結果、TAA投与群においてZone 1で細胞質の淡明化とともに、Zone 3での肝細胞腫大と好酸性化が存在し、核小体も目立った。AUDA投与群においては、Zone 1で細胞質の淡明化が存在した。また、DEHP投与群においては、びまん性肝細胞肥大が存在した。QDH投与群では、投与群との差がはっきりしなかった(図1)。

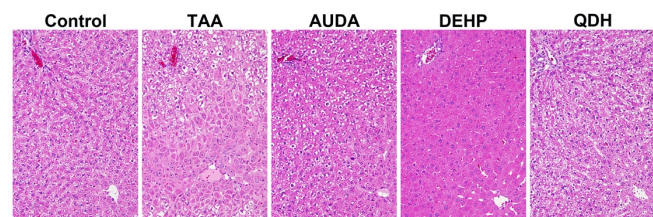


図1. 各物質を投与したラット肝組織像

各肝組織からRNAを抽出した結果、平均67.7 ± 20.4 μgのtotal RNAを回収し、A260/A280吸光度比が平均2.11 ± 0.01と良い状態だった。マイクロアレイ解析を行った結果、対照群に対してZ scoreが2倍以上、発現比が1.5倍以上変動した遺伝子は、TAA投与群においては上昇475、低下390、AUDA投与群では上昇132、低下240、DEHP投与群では上昇313低下239、QDH投与群では上昇191、低下157の遺伝子を認めた。

各投与群における遺伝子発現データについて、構築済の非遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、非遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った結果、TAAおよびDEHPは陽性と判定され、QDHは陰性と判定された一方で、AUDAは陰性と判断された。

D. 考察

今回、発がん物質として同定できたTAAおよびDEHPは、強い肝組織像の変化が存在し、対照群との遺伝子発現が変化した遺伝子数も多く認められた。TAA投与群においては体重抑制が存在し、DEHP投与群においては肝重量増加を認めたことから、化学物質の強い影響は反映される状況だったと推察する。一方、AUDA投与群においては、体重や肝重量については対照群を差が認められず、肝組織像で軽度の変化があるものの、発現の変化した遺伝子数は非発がん物質であるQDH投与群と同程度であり、がん原性試験の投与量を4週間投与した場合には、その影響が弱く発がん物質として検出が困難であった可能性がある。

E. 結論

化審法で実施される28日間反復投与試験において抽出した肝臓から得られたRNAを用いた遺伝子セットによる肝発がん性予測モデルは、非遺伝毒性肝発がん物質の検出法として有用であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. Arch Toxicol. 2020; 94: 927-37.
- 2) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagai T, Etani T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway. Cancer Sci. 2020; 111: 1165-79.
- 3) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. Int J Mol Sci. 2020; 21: 7746.
- 4) Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Toyama T, Takahashi S. The standard form of CD44 as a marker for invasion of encapsulated papillary carcinoma of the breast. Pathol Int. 2020; 70: 835-43.
- 5) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. Molecules. 2020; 25: 2737.
- 6) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. Arch Toxicol. 2020; 94: 4085-97.
- 7) Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. Carcinogenesis. 2020; 41: 1145-57.
- 8) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. Toxicology. 2020; 429: 152325.

- 9) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
- 10) Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 2020; 12: 558.
- 11) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 2021; 336: 32-8.
- 12) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 1216.

2. 学会発表

- 1) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase阻害剤apocyninによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第109回日本病理学会総会、Web開催（2020年8月）
- 2) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. ラット膀胱尿路上皮のニコチンによる増殖

はNADPH oxidase阻害剤apocyninにより抑制される. 第79回日本癌学会学術総会、Web開催（2020年10月）

- 3) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明. 第 93 回産業衛生学会、Web 開催（2020 年 4 月）
- 4) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催（2020 年 6 月）
- 5) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催（2020 年 10 月）
- 6) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、山下依子、稲熊真悟、高橋 智. LuteolinはSTAT3経路とDPD発現を低下させ膀胱癌を抑制する. 第109回日本病理学会総会、福岡（2020年4月）
- 7) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase阻害剤apocyninによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第37回日本毒性病理学会総会、Web開催（2020年1月）

G. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和2年度分担研究報告書

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
(20KD0101)

分担研究項目：遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立

研究分担者 豊田 武士 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨

本研究では、非遺伝毒性肝発がん物質による28日間反復経口投与試験を実施し、遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立を目指す。令和2年度は、6週齢の雄SDラットに0.125% Chlorendic acid (CRA)、5% Ponceau 3R (CI16155)、0.5% Clofibrate (CFB)、0.75% Caprolactamを28日間反復経口投与し、肝臓の病理組織学的検索および遺伝子発現解析用のRNA抽出を行った。その結果、肝発がん物質3種(CRA, CI16155, CFB)は短期間の投与においても肝細胞肥大等、肝臓にそれぞれ特徴的な病変を誘発することが明らかとなった。今後、遺伝子セットを用いた肝発がん性短期検出法の開発に向け、追加の被験物質による検討を実施する予定である。

A. 研究目的

化審法の規制区分「監視化学物質」および「優先評価化学物質」には、スクリーニング毒性試験の結果から健康影響の懸念が評価されているものの、慢性毒性や発がん性が不明の物質が多く存在する。しかし、それらの物質すべてを長期試験により検討することは、莫大な費用や時間等を必要とするため困難である。そこで、化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に評価できる試験法および試験スキームの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、国民生活の安全・安心を保証する。

本研究では、化学物質の標的となる臓器の大半は肝臓であることに着目し、肝発がん性を短期間で高精度に検証できるシステムを確立するとともに、「監視化学物質」および「優先評価化学物質」について発がん性評価を行う。平成29年度～令和元年度にかけて、「化学物質の有害性評価の迅速化・高精度化・標準化に関する研究」(鰐淵班)で開発した「遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」と「DNAアダクトーム解析による遺伝毒性/発がん性評価」は、いずれも9割を超える正答率で、遺伝毒性肝発がん物質を検出または遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質を分類できる試験法である。そこで、令和2～3年度に「監視化学物質」および「優先評価化学物質」を含め検討物質数を増やし、これらの試験法をより信頼性の高い評価法へと発展させ、加えて「遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」のOECDテストガイドライン化を目指す。また、上記試験法が対応できない非遺伝毒性肝発がん物質に対して、先行研究で開発した発がん機序別に分類できる「遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」を確立する。令和2年度は既知の非遺伝毒性肝発がん物質を主体に、令和3年度以降は「監視化学物質」および「優先評価化学物質」を含め検証および改良し、OECDテストガイドライン化を

目指す。最終的に、これら3つの試験法を組み合わせた短期肝発がん性総合評価スキームの確立を目指す。

B. 研究方法

令和2年度は、被験物質として非遺伝毒性肝発がん物質3種：Chlorendic acid (CRA)、Ponceau 3R (CI16155)、Clofibrate (CFB)および非遺伝毒性非発がん物質1種：Caprolactam (CPL)を、6週齢の雄SDラットに28日間混餌投与した(一群4匹)。各物質の投与濃度はがん原性試験における高用量群を参考に、0.125% CRA、5% CI16155、0.5% CFBおよび0.75% CPLに設定した。

投与期間終了時に解剖し、肝臓および腎臓の重量を測定した。肝臓の病理組織学的検索を実施するとともに、凍結した肝臓組織から遺伝子発現解析用のtotal RNAを抽出した。マイクロアレイ(GeneChip Clarion D Assay, Affymetrix)による網羅的遺伝子発現解析を、(株)セルイノベーターに受託して実施した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

対照群および各被験物質投与群の、体重・摂餌/飲水量・被験物質摂取量を表1に示す。CFB・CPL投与群では体重増加量の抑制傾向が認められたものの、統計学的有意差はみられなかった。各投与群における被験物質の平均摂取量は、CRA:92.8、CI16155:5665、CFB:426.5、CPL:648.5 mg/kg体重/dayであった。各群の肝および腎重量を表2に示す。CRA投与群では肝相対重量の低下、CI16155・CFB投与群では肝絶対・相対重量の増加、CFB・CPL投与群では腎相対重量の増加がそれぞれ認められた。

表 1. 各投与群における体重・摂餌/飲水量・被験物質摂取量

Treatment	Body weight (g)		Food consumption (g/rat/day)	Water intake (g/rat/day)	Chemical intake (mg/kg/day)
	Initial	Week 4			
Control	179.9 ± 5.7	374.5 ± 32.9	25.8	32.3	-
CRA	180.1 ± 7.0	363.5 ± 25.0	22.1	32.4	92.8
CI16155	179.7 ± 7.3	371.0 ± 15.3	34.9	41.0	5665.2
CFB	179.6 ± 10.6	349.8 ± 36.7	24.8	35.5	426.5
CPL	179.6 ± 4.8	352.3 ± 13.3	25.1	35.9	648.5

CRA, chlorendic acid; CI16155, ponceau 3R; CFB, clofibrate; CPL, caprolactam.

表 2. 各投与群における肝および腎重量

Treatment	Liver weight		Kidney weight	
	Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
Control	13.6 ± 1.48	3.64 ± 0.20	2.70 ± 0.19	0.72 ± 0.05
CRA	11.9 ± 1.00	3.26 ± 0.07*	2.65 ± 0.20	0.73 ± 0.04
CI16155	17.2 ± 0.98**	4.65 ± 0.22**	2.82 ± 0.13	0.76 ± 0.05
CFB	19.3 ± 3.08*	5.49 ± 0.47**	3.08 ± 0.40	0.88 ± 0.04**
CPL	13.6 ± 0.65	3.87 ± 0.25	3.06 ± 0.30	0.87 ± 0.06**

*, **, P < 0.05 and 0.01 vs. Control by t-test, respectively.

CRA, chlorendic acid; CI16155, ponceau 3R; CFB, clofibrate; CPL, caprolactam.

肝臓の病理組織学的検索の結果、CI16155 投与群では軽微な小葉中心性肝細胞肥大が、CFB 投与群では軽度のび慢性肝細胞肥大がそれぞれ認められた(図 1)。また、CRA 投与群では、肝細胞の軽微な空胞化が小葉辺縁性に時折認められた。対照群およびCPL 投与群の肝臓では、明らかな病変は観察されなかった。

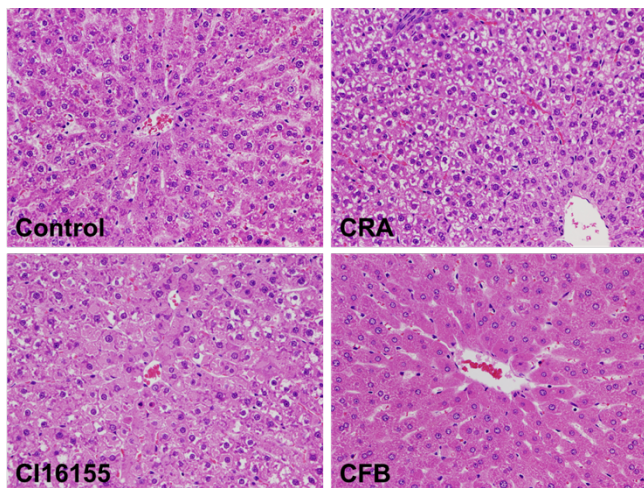


図 1. 各投与群の肝臓における病理組織学的変化

D. 考察

非遺伝毒性肝発がん物質 3 種および非発がん物質 1 種について、がん原性試験での投与濃度を用いたラット 28 日間反復経口投与試験を実施し、肝臓の病理組織学的検索を行った。その結果、CI16155 および CFB 投与群の肝臓には、それぞれすりガラス状および好酸性顆粒状の肝細胞肥大が認められた。

高脂血症治療薬である CFB は PPAR α 活性化を介してペルオキシソームを増加させ、組織学的に好酸性顆粒状の肝細胞肥大を誘発することが知られている。染色液として使用される CI16155 の肝毒性/発がん機序は未解明であるが、本研究で認められたすりガラス状肝細胞肥大は、酵素誘導を介した滑面小胞体の増加が起きている可能性を示唆する。CRA は主に難燃剤・樹脂原料として利用され、以前に実施された 13 週間反復経口投

与試験 (NTP, 1987) において、高用量 (0.5%以上) では肝細胞肥大・異型分裂像・胆管増生の誘導が報告されている。比較的低い用量 (0.125%) を用いた本研究ではこれらの病変は認められず、ごく軽微な空胞変性を示すにとどまった。CPL はナイロン原料として汎用され、IARC による発がん性評価において唯一、Group 4 「ヒトに対する発がん性がおそらくない」に分類されていた物質である (現在は Group 3 に統合)。本研究においても、肝臓に対する影響は認められなかった。

E. 結論

令和 2 年度は、非遺伝毒性肝発がん物質 3 種および非発がん物質 1 種について、ラットを用いた 28 日間反復経口投与試験を実施し、肝臓の病理組織学的検索および遺伝子発現解析用の RNA 抽出を行った。その結果、肝発がん物質 3 種は短期間の投与においても肝細胞肥大等、それぞれ特徴的な病変を誘発することが明らかとなった。今後、追加の被験物質による検討を実施し、遺伝子セットを用いた肝発がん性短期検出法の開発を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Cho YM, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K. Expression of stem cell markers as useful complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for γ -H2AX. Archives of toxicology. 2021; 95: 715-26.
- 2) Yamada T, Toyoda T, Ide T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Neuromuscular and vascular hamartoma of the small intestine in an F344 rat. Journal of toxicologic pathology. 2021; 34: 113-7.
- 3) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Specific expression of survivin, SOX9, and CD44 in renal tubules in adaptive and maladaptive repair processes after acute kidney injury in rats. Journal of applied toxicology. 2021; 41: 607-17.

2. 学会発表

- 1) 豊田武士、松下幸平、山田貴宣、赤木純一、森川朋美、小川久美子. 腎発がん物質早期検出指標としての γ -H2AX の応用可能性: 用量相関性の検討. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催、(2021 年 1 月)
- 2) 豊田武士、小川久美子. ラット膀胱粘膜における γ -H2AX 形成を指標とした芳香族アミンの膀胱傷害性および発がん性評価. 第 79 回日本癌学会学術総会、広島県、(2020 年 10 月)
- 3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子. オルト-トルイジン類似構造を持つ芳香族アミンによるラット膀胱傷害および遺伝子発現解析. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催、(2020 年

6月)

- 4) 赤木純一、曹永暉、豊田武士、水田保子、井手鉄哉、小川久美子. ラット肝臓標本を用いた肝発がん物質早期検出のためのバイオマーカーの探索. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催、(2021年1月)
- 5) 山田貴宣、原田賢吾、豊田武士、小川久美子、中山千里、田川義章、奥山学. SDラットに認められた真正半陰陽の一例. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催、(2021年1月)
- 6) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 急性腎障害から慢性腎臓病への進展におけるCD44の役割. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催、(2021年1月)
- 7) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、齋島由二. RNAアプタマーを利用した組織再生を促進する新規機能性医用材料の創製に関する研究. 第58回日本人工臓器学会大会、高知県、(2020年11月)
- 8) 赤木純一、豊田武士、小川久美子. 肝発がん物質投

与ラット肝細胞における γ -H2AX誘導と細胞増殖活性の相関. 第79回日本癌学会学術総会、広島県、(2020年10月)

- 9) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 腎虚血再灌流障害モデルラットを用いた急性腎障害から慢性腎臓病への進展メカニズムの解明. 第163回日本獣医学会学術集会、Web開催、(2020年9月)
- 10) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. mRNA-microRNA統合解析を用いた腎代償性メカニズムの包括的解析. 第47回日本毒性学会学術年会、Web開催、(2020年6月)

G. 知的所有権の取得状況

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

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
(20KD0101)

分担研究項目：遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立

研究分担者 横平 政直 香川大学医学部腫瘍病理学 准教授

研究要旨

TGP由来ラット肝臓遺伝子発現データをもとに構築した非遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力を検証するための検討を行った。香川大学担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質2種：Phenobarbital, sodium (500 mg/L)、1,4-Dioxane (5 g/L) と、非肝発がん物質2種：Phytic acid (2.5%)、Cyclohexanone (6.5 g/L) を飲水投与し、肝臓における遺伝子の発現変化を網羅的に調べた。その結果、陽性コントロールである、Phenobarbitalや1,4-Dioxaneが発がん物質として検出されなかった。陰性コントロールであるPhytic_acidやCyclohexanoneについては、陰性であり、予想通りの結果となった。

A. 研究目的

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

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

平成29年度および平成30年度の検討の結果、遺伝毒性発がん物質の検出に本モデルの有用性が確認された一方で、擬陽性や偽陰性を示す物質が認められた。令和元年度（平成31年度）では、偽陰性物質についてさらに投与容量の設定を詳細に検証する検討を行った。その結果、本モデルでは大多数の遺伝毒性肝発がん物質の検出を行うことができると考えられるが、稀に偽陰性となる物質があり、投与濃度等に留意する必要があると考えられた。

令和2年度では、TGP由来ラット肝臓遺伝子発現データをもとに構築した非遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力をさらに検証するため、種々の化学物質をラットに4週間投与し、肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。

B. 研究方法

OECD テストガイドラインの TG407：げっ歯類における28日間反復経口投与毒性試験を基に動物実験を行っ

た。6週齢SD雄ラットに被験物質を28日間投与後に屠殺剖検を行い肝臓を採取した。肝臓からRNeasy mini kit（キアゲン）を用いてtotal RNAを抽出・精製し、microarrayを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ごとの遺伝子発現変化データを取得した。得られた遺伝子発現変化のうち、以前に非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた106遺伝子セットを用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出（サポートベクターマシンの数理工学的アルゴリズムによるモデル）及び発がん機序に基づいた分類を行い、検出法の特異性及び感受性について検証した。

本研究全体における動物試験は4施設で行われた。

香川大学担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質2種：Phenobarbital, sodium (500 mg/L)、1,4-Dioxane (5 g/L) と、非肝発がん物質2種：Phytic acid (2.5%)、Cyclohexanone (6.5 g/L) を飲水投与した。

動物試験プロトコールは事前に共有・配布し、プロトコールに従い試験を実施した。遺伝子発現については、リアルタイムPCRでのデータを取得した。

日本チャールズブリバー社（神奈川県厚木）より購入した4週齢のSDラット（雄性）について、2週間の馴化期間の後に実験を開始した。馴化期間に体重測定を行い、各群の平均体重にばらつきがないよう群分けを行った。実験中は、被験物質を水道水に混じて遮光給水瓶にいれ、自由に摂取させた。投与期間中は、体重測定を週1回、飲水量および摂餌量についても週1回の測定を行った。実験開始29日目に剖検を行ったが、剖検は、イソフルラン（abbvie #B506）吸入麻酔後、腹部大動脈から自然放血により安楽死させた。安楽死後、臓器に肉眼的異常の有無を観察した。肝臓を摘出し、RNA抽出用として、外側左葉(LL)を摘出後、下端辺縁部を約2cm×0.5cmの大きさに2スライス切り出した。それぞれ1mLのRNAlaterが入った1.5mLチューブへ移した（合計2本、そのうち1本は、他施設でのバリデーション用）。1.5mLチューブを4℃で一晩保管後、-80℃へ長期保管した。凍結保存サンプル用として、RNA抽出用に採材した後の残りの外側

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

肝臓からのtotal RNA抽出はRNeasy mini kit (キアゲン)を使用し、3mm×3mm程度の肝組織片からtotal RNAを抽出した。1群4匹から得たRNAをそれぞれ同一量混ぜて、一つのサンプルとした。アレイ解析は株式会社セルイノベーターに受託した。

アレイ解析の結果について、遺伝子発現データを構築済の肝発がん性予測モデル(サポートベクターマシンのような数理学的アルゴリズムによるモデル)に入力し、肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った。

(倫理面の配慮)

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

C. 研究結果

Phytic acid群において実験開始1週目から有意な飲水量(図2)および摂餌量(図3)の低下が見られ、2週目から有意な体重減少(図1)を認めた。また、実験27日目にPhytic acid群の2匹が死亡した。このため、1群4匹から得たRNAをそれぞれ同一量混ぜて、一つのサンプルとする予定であったが、この群のみ2匹分のRNAによりアレイ解析を行った

剖検時の体重および肝重量を表1に示す。Phenobarbital, sodium群およびPhytic acid群について有意な体重減少を認めた。また、肝重量について、Cyclohexane群では絶対重量および相対重量のいずれも有意な増加を認めた。Phytic acid群では絶対重量の有意な低下が見られた。

肉眼所見および病理組織所見(図4)では、いずれの群もControl群と比べて、肝臓に明らかな変化は認められなかった。

アレイ解析の結果を肝発がん性予測モデルに入力したところ、今回検討した4物質のいずれも「negative」の結果であった。

D. 考察

Phytic acid群では絶対重量の有意な低下が見られたが、相対重量では群間の有意差は認められず、肝重量減

少は体重減少に伴う変化と考えられた。実験当初から被験物質を混じた飲水量が少なく、それに伴って摂餌量の減少および体重減少を来したと考えられる。

アレイ解析からの肝発がん性予測モデルの結果について、positive controlである、Phenobarbitalや1,4-Dioxaneが発がん物質として検出されなかった。Phytic acid や Cyclohexanoneについては、陰性であり、予想通りの結果となった。

E. 結論

今回、遺伝子セットを用いた判定の結果、Phytic acid や Cyclohexanone については、陰性であり、予想通りとなった。一方で、positive controlである、Phenobarbitalが発癌物質として検出されなかった。今後、これらの偽陰性の原因について検討を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakano-Narusawa Y, Yokohira M, Yamakawa K, Saoo K, Imaida K, Matsuda Y. Single Intratracheal Quartz Instillation Induced Chronic Inflammation and Tumorigenesis in Rat Lungs. *Sci Rep.* 2020; 10: 6647.
- 2) Kishi S, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Kanie S, Hashimoto N, Saoo K, Yokohira M, Imaida K, Matsuda Y. Preexisting diabetes mellitus had no effect on the no-observed-adverse-effect-level of acetaminophen in rats. *J Toxicol Sci.* 2020; 45: 151-162.
- 3) Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Matsuda Y, Imaida K. Lung proliferative lesion-promoting effects of left pulmonary ligation in A/J female mice. *Pathol Int.* 2020; 70: 340-347.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 剖検時体重および肝重量

Groups	Treatment	No.	Body weights (g)	Liver weights	
				Absolute (g)	Relative (%)
1	1,4-Dioxane	4	384.8 ± 22.7	13.1 ± 1.0	3.4 ± 0.2
2	Phenobarbital, sodium	4	365.5 ± 31.5*	14.7 ± 2.0	4.0 ± 0.2
3	Phytic acid	2	276.5 ± 28.9*	9.2 ± 0.7*	3.3 ± 0.1
4	Cyclohexanone	4	441.7 ± 20.3	20.7 ± 2.0*	4.7 ± 0.4*
5	Control	4	429.5 ± 20.1	16.6 ± 1.6	3.9 ± 0.2

* P<0.05 vs group 5, control group.

図 1 体重の経時的変化

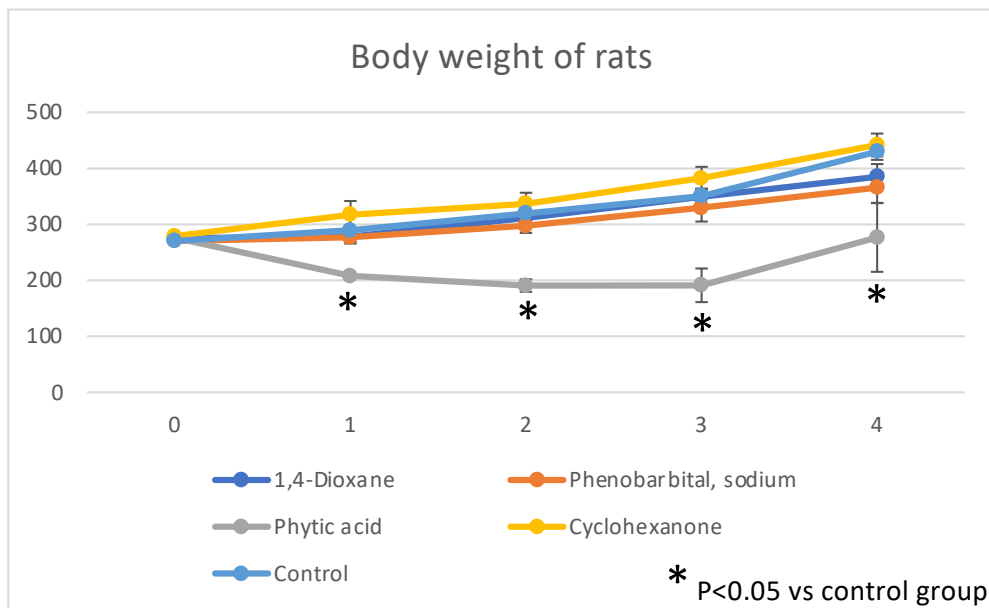


図 2 飲水量の経時的変化

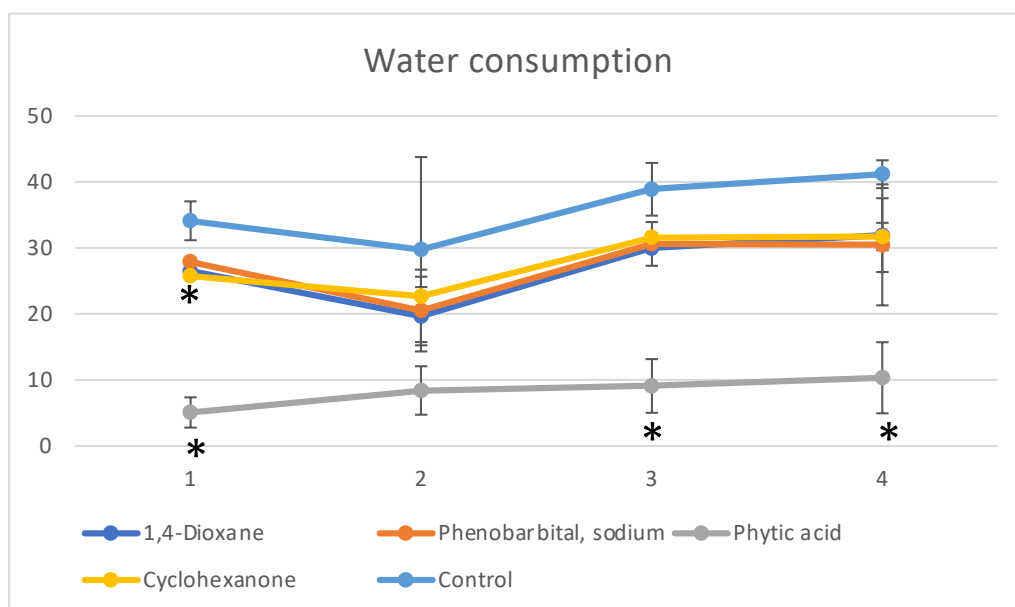


図3 摂餌量の経時的変化

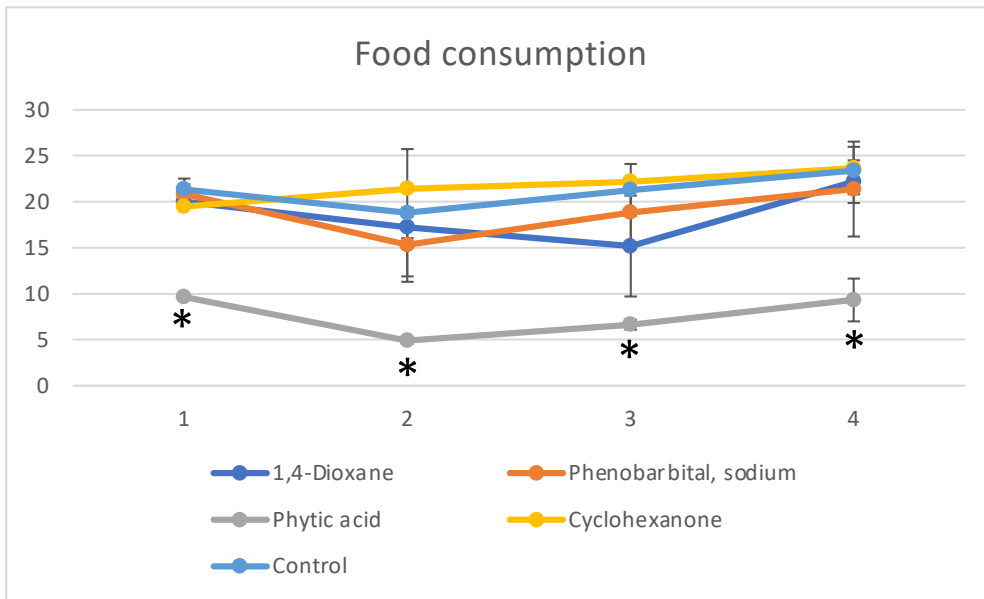
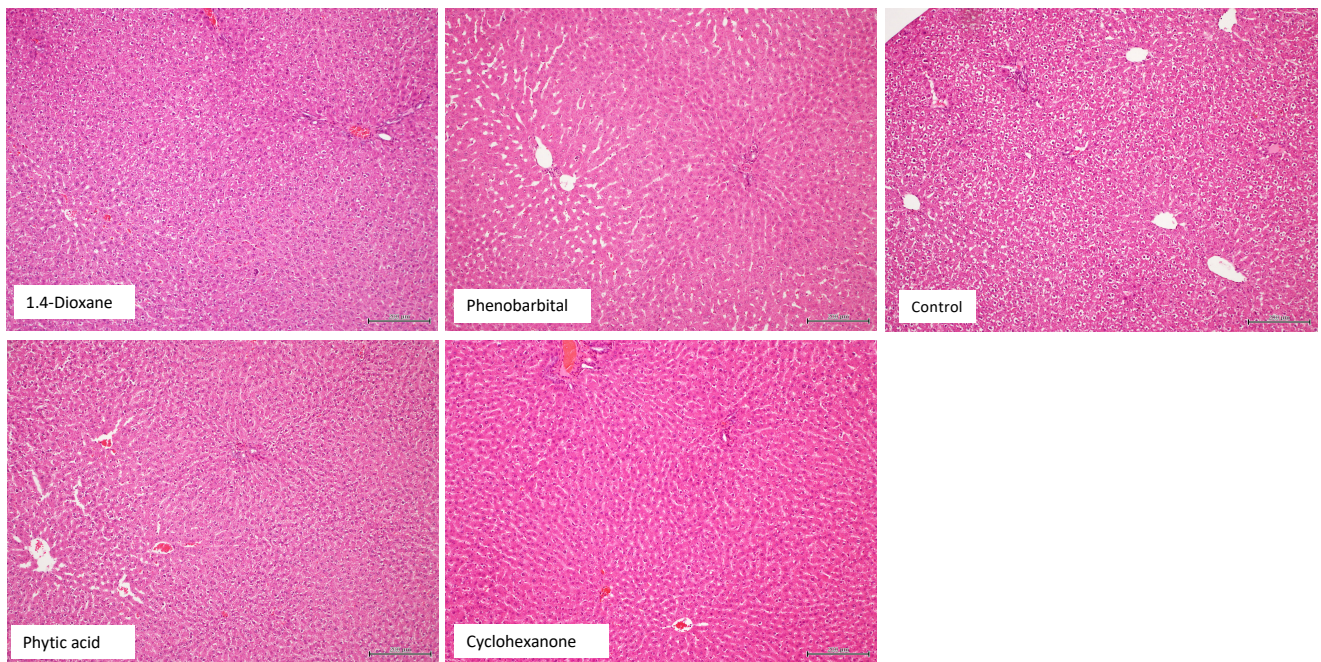


図4 各群のラット肝臓の病理組織像



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和2年度分担研究報告書

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
(20KD0101)

分担研究項目：遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立

研究分担者 加藤 寛之 名古屋市立大学大学院医学研究科 実験病態病理学 助教

研究要旨

本研究では化学物質の標的となる臓器の大半は肝臓であることに着目し、肝発がん性を短期で高精度に検証できるシステムを確立するとともに、「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」についての発がん性評価を行う。本年度は肝発がん性のある Decabromodiphenyl oxide、dl-Ethionine、Doxylamine succinate、非発がん物質である Hexachlorophen の 4 物質について、28 日間混餌投与を行い、以前に確立した発がん性予測遺伝子セットで評価を行った。その結果、Decabromodiphenyl oxide、dl-Ethionine では軽度の組織学的変化、あるいは Ki-67 陽性率の増加傾向はみられた。しかし、いずれの物質においても発がん性予測遺伝子セットによる発がん性の検出はできなかった。今回使用した発がん性予測遺伝子セットは特異度の高い評価系であり、本試験においても Hexachlorophen では発がん性陰性の結果を示したが、発がん性予測における感度が低く、被検物質の投与方法・濃度などの問題点を抽出すると同時に遺伝子セットの再検討が必要と考える。

A. 研究目的

化審法の規制区分「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」には、スクリーニング毒性試験の結果から健康影響の懸念が評価されているものの、慢性毒性や発がん性が不明の物質が多く存在する。しかし、それらの物質を全て長期試験により検討することは、莫大な費用や時間等を必要とするため困難である。

本研究では化学物質の標的となる臓器の大半は肝臓であることに着目し、肝発がん性を短期で高精度に検証できるシステムを確立し、「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」について発がん性評価を行う為、平成 29 年度～令和元年度「化学物質の有害性評価の迅速化・高精度化・標準化に関する研究」（鰐淵班）においては遺伝性肝発がん物質について 10 種類の遺伝子発現を RT-PCR を行い定量することにより 60 物質（肝発がん物質 23 物質）において感度 82.6%、特異度 97.3%の検出をすることが可能であった。本研究においては非遺伝毒性肝発がん物質の検出を目的とし、Open TG-GATEs における 15 の非遺伝毒性肝発がん物質を投与した肝臓のマイクロアレイの結果から構築した 106 遺伝子での評価系を用いて、その有用性について検討する。

令和 2 年度においては、4 研究施設で 16 物質を担当し、本大学では非遺伝毒性肝発がん物質である”Decabromo- diphenyl oxide (Decabromodiphenyl ether: decaBDE)”、”dl-Ethionine (DL - ET)”、”Doxylamine succinate (DOX)”、非発がん物質である”Hexachlorophene (HCP)”のラット 28 日間混餌投与試験を行い、その肝臓から RNA を抽出し、発がん性の評価を検討した。また、本評価系は Open TG-GATEs 内での 28 日間の強制胃内投与、もしくは尾静脈投与の反復投与によるマイクロアレイの結果を用い、

評価物質として非遺伝毒性肝発がん物質 15 物質、非肝発がん物質 42 物質の評価を行い、特異度 100%、感度 77%の結果を得ている。

B. 研究方法

6週齢SD雄ラットにdecaBDE (5%)、DL-ET (0.1%)、DOX (0.2%)、HCP (0.015%)を投与する群と基礎食のみのControl群(Cont)の5群を設定し、各群4匹とした。それぞれの群に対し28日間被検物質の混餌投与を行った。その後解剖を行い、肝臓のHEによる組織学的解析、Ki-67、GST-Pの免疫組織学的解析を行った。Ki-67陽性率は外側左葉、内側右葉、右葉尾部全体の陽性率をAperio CS2(Leica)で測定した。GST-P陽性細胞は全体における陽性細胞数を計測した。また肝臓の外側左葉の一部を摘出後、RNA later で凍結保存した。その検体からmRNAを抽出し、各群4個体からmRNA 1µgを合わせた検体に対し、Clariom D Assayのマイクロアレイ解析を行い、以前に構築した106遺伝子セットにより発がん性評価を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は名古屋市立大学動物実験委員会及び名古屋市立大学理事長の承認を得て行った(承認番号:医動20-026)。実施は動物実験指針や3Rの原則を遵守して、動物愛護や苦痛の緩和に十分留意して実験を行った。

C. 研究結果

いずれの群においても実験途中で死亡した個体はみられなかった。薬剤摂取量は実験期間全体の平均でdecaBDE群:3,678mg/kg/day、DL-ET群:78mg/kg/day、DOX群:145mg/kg/day、HCP群11mg/kg/dayであった。DL-

ET群では投与初期に摂餌量低下 (Cont群: 22.1g/day/rats, DL-ET群: 19.9g/day/rats)があったために体重増加抑制が見られたが、屠殺時の体重では有意差はみられなかった。屠殺時の臓器重量は、肝重量がdecaBDE投与群で有意に増加していた (表1)。

肝の組織学的検討により、decaBDE群にはcentrilobular hepatocellular hypertrophyが見られた。また、DL-ET群では肝細胞の核分裂像が散見された。一方でDOX群、HCP群では明らかな組織学的変化はみられなかった (図1)。肝臓各葉におけるKi-67陽性率は、DL-ET群で高い傾向がみられたが、いずれの群間においても有意な差は見られなかった (図2)。GST-P陽性細胞数 (個/mm²) はCont群: 0.06 ± 0.08, decaBDE群: 0.13 ± 0.20, DL-ET群: 0.14 ± 0.23, DOX群: 0.11 ± 0.08, HCP群: 0.25 ± 0.24を示し、群間で有意差はみられなかった。

肝臓から抽出したmRNAのマイクロアレイデータ内の103遺伝子で発がん性を予測した結果、被検4物質のいずれも肝発がん性は陰性の結果を示した。

Treatment	n	Body weights (g)	Liver		Kidneys	
			Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
Control	4	415 ± 27	15.8 ± 1.4	3.8 ± 0.3	3.1 ± 0.2	0.75 ± 0.06
Decarmodiphenyl oxide	4	423 ± 16	19.2 ± 0.8**	4.5 ± 0.2**	2.9 ± 0.1	0.69 ± 0.03
dl-Ethionine	4	380 ± 22	14.6 ± 0.8	3.8 ± 0.3	2.9 ± 0.3	0.77 ± 0.04
Dpxylamine succinate	4	418 ± 18	16.6 ± 1.1	4.0 ± 0.1	3.1 ± 0.3	0.74 ± 0.05
Hexachlorophene	4	421 ± 11	17.1 ± 1.1	4.1 ± 0.3	3.2 ± 0.2	0.75 ± 0.05

** : P < 0.01 v.s. control (Dunnett's test)

表1: 屠殺時ラット体重、臓器重量

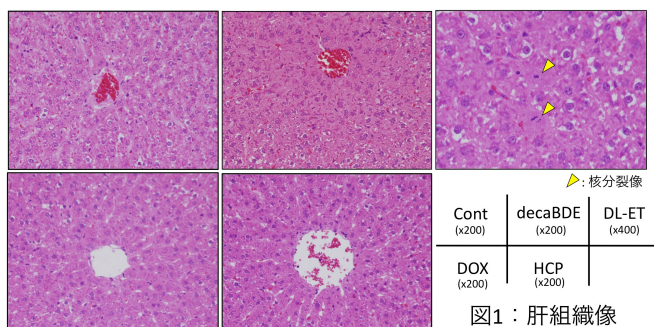


図1: 肝組織像

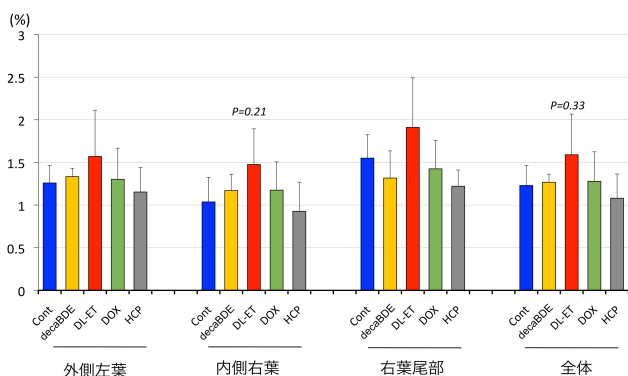


図2: 肝臓の各葉におけるKi-67陽性率

D. 考察

本試験で用いた被検物質投与量は、長期発がん性試験の結果をもとに決定している。decaBDEはマウスにおける2年間の発がん性試験において3,200mg/kg/dayで肝細胞癌の発生の有意な上昇 (control:4/50匹, decaBDE:14/50匹) を認めている。ラットの2年間発がん

試験では最大用量が2,240mg/kg/dayであり、最大用量においては線維化や結節性病変 (過形成や腺腫) の増加はみられているが明らかな肝細胞癌の発生は見られていない。本試験では3,678mg/kg/dayの投与量となっており、2年間の発がん性試験における発がん用量には達している。

DL-ETに関しては、本試験と同様の0.1%の用量でWistarラットに34週間投与することで、肝細胞癌の発生を認めている (control: 0/9匹, DL-ET:3/12匹)。一方で、0.25%の用量でWistar, Fischer, SDラットに5ヶ月以上の投与を行うと、半数以上に肝細胞癌の発生が観察されている。28日間のSDラットにおける強制胃内投与試験においては、本試験とほぼ同量の80mg/kg/dayで軽度の体重抑制や数匹に肝臓の組織学的変化がみられているが、本試験においてもほぼ同様の結果が得られている。投与量としてはある程度肝毒性を示す量に達していると考えられる。

DOXにおいては、ラットの2年間発がん性試験から95mg/kg/dayに対して肝細胞癌の発生 (2/57匹)、肝細胞腺腫+肝細胞癌の発生の有意な上昇 (control:0/57匹, DOX:5/57匹) を認めている。本試験では145mg/kg/dayの投与量を得られているが、遺伝子セットの評価系の構築時にはThe Carcinogenic Potency Database (CPDB) におけるTD50 (腫瘍発生率が50%となる用量) 以上の投与量での変化を基準にしている。decaBDE, DL-ET, DOXのTD50はそれぞれ3,340, 9.76, 1,610 mg/kg/dayであり、本試験におけるDOXの投与量はTD50に達しておらず、組織学的変化も乏しいことから、遺伝子セットによる解析で良好な結果が得られなかった可能性がある。

今回のマイクロアレイを用いた評価はRat Clarion D Assay (Affymetrix) のプラットフォームを用いて行っている一方、評価系の構築の際に使用したOpen TG-GATEsはRat Genome 230 2.0 array (Affymetrix) を使用しており、今回は106遺伝子ではなく103遺伝子で評価を行っている。そのため、プラットフォームの違いによる影響を完全には否定できない。

以上の事から、本年度の結果は被検物質の投与方法、濃度および遺伝子セットの違いに起因する可能性がある。次年度には上記を考慮した投与方法、投与量とともに、評価系で使用する遺伝子の再検討を行う必要がある。

E. 結論

本年度実施した非遺伝毒性肝発がん物質において、化審法で実施される28日間混餌投与試験での肝発がん性の検出は既存の遺伝子セットでは困難であった。投与濃度、経路、投与物質、遺伝子セットについて再度修正し、実験を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Kato H](#), Naiki-Ito A, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. Carcinogenesis. (In press; DOI:

- 10.1093/carcin/bgab017).
- 2) Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, Kato H, Naiki-Ito A, Watanabe K, Nagayasu Y, Hosokawa Y, Takiguchi S, Kasugai K, Kasai K, Inaguma S, Takahashi S. PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients. *Virchows Arch.* (In press; DOI: 10.1007/s00428-021-03062-0).
 - 3) Tsuda H, Yoshida M, Akiyama F, Ohi Y, Kinowaki K, Kumaki N, Kondo Y, Saito A, Sasaki E, Nishimura R, Fujii S, Homma K, Horii R, Murata Y, Itami M, Kajita S, Kato H, Kurosumi M, Sakatani T, Shimizu S, Taniguchi K, Tamiya S, Nakamura H, Kanbayashi C, Shien T, Iwata H. Nuclear grade and comedo necrosis of ductal carcinoma in situ as histopathological eligible criteria for the Japan Clinical Oncology Group 1505 trial: an interobserver agreement study. *Jpn J Clin Oncol.* 2021; 51: 434-43.
 - 4) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 2021; 336: 32-8.
 - 5) Nishikawa S, Uemoto Y, Kim TS, Hisada T, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Dong Y, Sugiura H, Okuda K, Kato H, Osaga S, Takahashi S, Toyama T. Low RAI2 expression is a marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2021.
 - 6) Matsuyama N, Naiki T, Naiki-Ito A, Chaya R, Kawai T, Etani T, Nagai T, Kato H, Kubota Y, Yasui T. Novel case of androgen receptor-positive cancer of unknown primary without serum prostate-specific antigen elevation that became progression free in the long term after primary combined androgen blockade. *IJU Case Rep.* 2021; 4: 59-63.
 - 7) Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 2020; 12.
 - 8) Uemoto Y, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Asano T, Hisada T, Nishikawa S, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Okuda K, Sugiura H, Kato H, Takahashi S, Toyama T. Sentinel lymph node biopsy may be unnecessary for ductal carcinoma in situ of the breast that is small and diagnosed by preoperative biopsy. *Jpn J Clin Oncol.* 2020.
 - 9) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
 - 10) Nozaki S, Naiki T, Naiki-Ito A, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T. Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis. *Andrology.* 2020.
 - 11) Nakanishi H, Sawada T, Kaizaki Y, Ota R, Suzuki H, Yamamoto E, Aoki H, Eizuka M, Hasatani K, Takahashi N, Inagaki S, Ebi M, Kato H, Kubota E, Kataoka H, Takahashi S, Tokino T, Minamoto T, Sugai T, Sasaki Y. Significance of gene mutations in the Wnt signaling pathway in traditional serrated adenomas of the colon and rectum. *PLoS One.* 2020; 15: e0229262.
 - 12) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 4085-97.
 - 13) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 2020; 25.
 - 14) Kato T, Matsuo Y, Ueda G, Aoyama Y, Omi K, Hayashi Y, Imafuji H, Saito K, Tsuboi K, Morimoto M, Ogawa R, Takahashi H, Kato H, Yoshida M, Naitoh I, Hayashi K, Takahashi S, Takiguchi S. Epithelial cyst arising in an intrapancreatic accessory spleen: a case report of robotic surgery and review of minimally invasive treatment. *BMC Surg.* 2020; 20: 263.
 - 15) Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Toyama T, Takahashi S. The standard form of CD44 as a marker for invasion of encapsulated papillary carcinoma of the breast. *Pathol Int.* 2020.
 - 16) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagai T, Etani T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway. *Cancer Sci.* 2020; 111: 1165-79.

2. 学会発表

- 1) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、高橋智. エラグ酸の膵発癌抑制効果と膵癌におけるレジスチンの効果の検討. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、浜松 (2021 年 1 月)
- 2) Kato H, Naiki-Ito A, Komura M, Inaguma S, Takahashi S. Ellagic acid prevents pancreatic carcinogenesis in hamster model. The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Hiroshima (2020.10)
- 3) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、山下依子、稲熊真悟、高橋 智. Luteolin は STAT3 経路と DPD 発現を低

下させ膵発癌を抑制する. 第 109 回日本病理学会総会、福岡 (2020 年 4 月)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
(20KD0101)

分担研究項目：遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 環境リスク評価学 准教授

研究要旨

本研究では化学物質の標的となる臓器の大半は肝臓であることに着目し、「遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」を確立するとともに、問題となる「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」について発がん性評価を行う。本年度は、「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」を含む6化学物質を用いたラット単回投与を行い、投与24時間後の肝臓におけるマーカー遺伝子（10遺伝子）の発現データをqPCRで取得し、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いて肝発がん性を予測した。その結果、「陽性」と判定されたものは、2遺伝毒性肝発がん物質であった。しかし、「優先評価化学物質」のphenylenediamineを含めた3遺伝毒性肝発がん物質は「陰性」と判定された。遺伝毒性陽性で発がん性不明の「監視化学物質」DB-134は「陰性」と判定された。今後、検出精度を確認するに、偽陰性物質について投与量を上げて再評価する必要があると考えられる。これまでに取得した69物質に対して、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度83%、特異度95%、正答率90%の高い精度で検出できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

生化学審法の規制区分「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」には、スクリーニング毒性試験の結果から健康影響の懸念を評価されているものの、慢性毒性や発がん性が不明の物質が多く存在する。しかし、それらの物質を全て長期試験により検討することは、莫大な費用や時間等を必要とするため困難である。そこで、化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に評価できる試験法および試験スキームの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、国民生活の安全・安心を保証する。

本研究では化学物質の標的となる臓器の大半は肝臓であることに着目し、肝発がん性を短期で高精度に検証できるシステムを確立するとともに、問題となる「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」について発がん性評価を行う。平成29年度～令和元年度「化学物質の有害性評価の迅速化・高精度化・標準化に関する研究」（鰐淵班）で開発した「遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」は正答率が9割を超える高精度試験系であるが、本研究で「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」を含め化学物質数を増やし、より信頼性の高い評価法へと発展させる。加えて「遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」のOECDテストガイドライン化を目指す。

本研究の特色は、化学物質の発がん性を迅速に予測できる評価法を構築することにある。多数の化学物質を同時に評価することにより、評価法の標準化を推進し、国際動向を見据えたOECDテストガイドライン化を

目指すことが本研究の独創的な点である。

令和2年度は、既知遺伝毒性発がん物質、「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」6物質について検討した。

B. 研究方法

6週齢の雄SDラットを8群に分け、被験物質の単回強制胃内投与試験を行った。被験物質に関する情報と投与濃度は表1に示す。判定対象物質として、優先評価化学物質1種（o-phenylenediamine (OPD)）、監視対象化学物質1種（Disperse Blue 134 (DB-134)）を、既知の遺伝毒性肝発がん物質4種（Safrole; 2-Nitrofluorene (2-NF); 2-Aminoanthraquinone (2-AAQ); 1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ)）の合計6物質を用いた。また、溶媒対照群（対照群）として0.5% Methyl cellulose (MC) 投与群、および陽性対照群として2-Nitropropane (2-NP) 投与群を設けた。

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

遺伝子発現については、リアルタイム PCR (qPCR)にてデータを取得した。肝臓からの total RNA 抽出と cDNA の合成はそれぞれ RNeasy mini kit (キアゲン) と Super Script VI VIL0 Maste Mix (Thermo Fisher Scientific) を使用した。得られた遺伝子発現データを我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル (サポートベクターマシンによる数理的アルゴリズムによるモデル) に入力し、判定を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

2-NP (陽性対照群) で 1 例が死亡した。2-NP、2-NF 群および 2-AAQ 群で対照群に比較して有意な体重増加抑制が認められた。また、2-NP および OPD 群で、絶対肝重量および相対肝重量の有意な減少が認められた。DB-134 群では、相対肝重量の有意な減少が認められたが、絶対肝重量に有意な変化はみられなかった。同群では体重が増加傾向を示したことから、相対肝重量の減少は体重増加に伴ったものである可能性が示唆された。2-AAQ 群で絶対肝重量の有意な減少が認められたが、相対肝重量に有意な変化はみられなかった。これには同群での体重減少が関連する可能性があると考えられた。

表1 令和2年度に検討した遺伝毒性肝発がん物質

投与物質	分類	LD50 (mg/kg)	投与量 (mg/kg)	判定	正否
0.5% Methyl cellulose (MC)	溶媒 (陰性対照物質)				
2-Nitropropane (2-NP)	遺伝毒性陽性肝発がん物質 (陽性対照物質)	720	240#	陽性	○
o-phenylenediamine (OPD) 優先評価化学物質	遺伝毒性陽性肝発がん物質	510	170#	陰性	×
Disperse Blue 134 (DB-134) 監視対象化学物質	遺伝毒性陽性「発がん性不明」	「不明」	1000*	陰性	
Safrole	遺伝毒性陽性肝発がん物質	1950	650#	陰性	×
2-Nitrofluorene (2-NF)	遺伝毒性陽性肝発がん物質	「不明」	1000*	陽性	○
2-Aminoanthraquinone (2-AAQ)	遺伝毒性陽性肝発がん物質	>3200	1000*	陽性	○
1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ)	遺伝毒性陽性肝発がん物質	「不明」	1000*	陰性	×

LD50の1/3に相当する用量。
*入手可能な情報に参考にして、1日単回投与試験での致死量は1000 mg/kgより低い可能性が高いと推定した。

病理組織学的には、2-NP 群および Safrole 群で肝細胞壊死および脂肪変性が認められた。2-NF 群では小葉中心性両染色変化が見られた。OPD 群、DB-134 群、ADBAQ 群では明らかな病理学的変化はみられなかった。

qPCR で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った (表 1)。本モデルでは、遺伝毒性ラット肝発がん物質を「陽性」、その他の物質を「陰性」と判定する。その結果、「陽性」と判定されたものは、遺伝毒性肝発がん物質である 2 物質 (2-NF、2-AAQ) であった。しかし、それ以外の 3 遺伝毒性肝発がん物質は「陰性」と判定された。遺伝毒性

陽性で発がん性不明である DB-134 は「陰性」と判定された。

D. 考察

我々が構築した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の有用性の検証では、「優先評価化学物質」OPD を含めたそれ以外の 3 遺伝毒性肝発がん物質は「陰性」と判定された。遺伝毒性陽性で発がん性不明の「監視化学物質」DB-134 は「陰性」と判定された。今後、検出精度を確認するに、偽陰性物質については投与量を増やして再評価する必要がある。これまでに検討した 69 物質に対して、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度 83%、特異度 95%、正答率 90% の高い精度で検出できる可能性が示唆された。なお、これまでに 2-NF、DB-134 及び ADBAQ のラットにおける経口 LD50 に関する報告はなかったが、本試験では、いずれの投与群においても死亡例がみられなかったことから、これらの物質の LD50 は 1000 mg/kg 以上であることが明らかになった。GSH 分類においては経口急性毒性区分 4 以上に該当することが示唆された。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, [Gi M](#), Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 2021; 336: 32-8.
- 2) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, [Gi M](#), Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 1216.
- 3) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, [Gi M](#), Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, 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.* 2020; 96: 180-7.
- 4) Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, [Gi M](#), Wanibuchi H, Nakatani T. Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-

resistant bladder cancer. *Cancer Lett.* 2020; 479: 89-99.

- 5) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
- 6) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 7746.
- 7) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 927-37.

2. 学会発表

- 1) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明、第 93 回産業衛生学会、WEB 開催 (2020 年 4 月)
- 2) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラ

ットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用、第 47 回日本毒性学会学術年会、WEB 開催 (2020 年 6 月)

- 3) 鰐淵英機、魏民. 職業曝露によるがん発生の要因解明と予防研究への展開、第 27 回がん予防学会総会、WEB 開催 (2020 年 9 月)
- 4) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice、第 79 回日本癌学会学術総会、WEB 開催 (2020 年 10 月)
- 5) 梯アンナ、鈴木周五、魏民、鰐淵英機. NASH 肝発がんにおける特異的候補分子および新規マーカーとして CACHD1 の役割. 第 79 回日本癌学会学術総会、広島、Web 開催 (2020 年 10 月)
- 6) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出、第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、WEB 開催 (2021 年 1 月)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和2年度分担研究報告書

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
(20KD0101)

分担研究項目：DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価

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

研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、高分解能精密質量分析装置(HRAM)を用いた DNA 付加体の網羅的解析手法 (HRAM-アダクトーム) を用いた遺伝毒性/発がん性予測モデルの構築に取り組んできた。本年度は、これまでの2年間で実施したデータセット (2018 データセットおよび2019 データセット) を統合し、複数の遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価を、当該研究により構築した HRAM-アダクトーム法により検討した。得られた統合データを線形判別分析(LDA)により分類したところ、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。これらデータを用いて Leave-One-Out 交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、50~65%の正答率となり、2018 データセットを単独で用いた場合 (88~94%) と比較して精度が低下することがわかった。この結果は、2019 年データセット単独での低い正答率が影響していると推測された。2018+2019 統合データセットから1被験物質を除いて LDA 解析を行ない、そのパターンの変化の大・中・小で分類を行なってみたところ、2019 年に試験した被験物質に変化の大きなものが多数存在することがわかった。このことは、2018 年度に使用した被験物質は互いに類似した特徴を持っており、2019 年度は互いに異なる特徴をもつ物質によって構成されていることが示唆される。2018 データと2019 データの正答率の違いは、このような被験物質のもつ特徴に起因する可能性が考えられた。今後は、2018+2019 統合データセットの正答率向上について更に検討を行う。また、各グループの予測に重要な付加体の探索やアダクトームデータに化学物質構造データを追加するなど予測精度の向上についても検討する。

A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験 (変異原性試験)、コメットアッセイ (DNA 損傷試験)、小核試験 (染色体異常試験) などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは化学物質の発がん性の予測や有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway, AOP) の解析は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を開発することが必要であると考えられる。

我々は、高分解能精密質量分析装置 (HRAM) を用いた DNA 付加体の網羅的解析手法 (HRAM-アダクトーム) を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて検討してきた。その結果、トランスジェニックマウスモデルに対して変異原性を示すマグネタイトナノ粒子を気管内投与したマウス肺で、マグネタイトナノ粒子が誘発する G:C→A:T 及び G:C→T:A 変異の基となる付加体 (etheno-dC、 ϵ -dC) を含む複数の付加体形成を確認することを報告した。また、最近では Ames 試験陰性の発がん物質である 1,4-dioxane を投与したラット肝臓に複数の付加体形成が観察され、そのうちの一つは 8-oxodG に相当することを見出した。 ϵ -dC および 8-oxodG はいずれも酸化ストレス・炎症などに伴って形成

される付加体であり、マグネタイトナノ粒子や 1,4-dioxane による変異原性誘発はこれら化学物質の直接的な作用ではなく、宿主反応を介した間接的な作用によることが推測できた。この結果は、アダクトーム法では AOP の取得も可能であり、化学物質の安全性評価手法として有用であることを示唆するものである。

そこで本研究では、アダクトーム法を用いた化学物質の安全性評価法の深化と精度向上、および動物実験代替法への応用開発を目的とする。今年度は、ラットを用いた *in vivo* モデルを用い、肝臓をターゲットとした複数の遺伝毒性/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓における DNA 損傷を HRAM-アダクトームにより検討し、DNA 付加体の生成を指標とした有害性評価の検証を行なう。

B. 研究方法

雄性 SD ラット (各群それぞれ5匹) に遺伝毒性肝発がん物質 (2018年; 9種、2019年; 13種、計22種)、遺伝毒性非発がん物質 (2018年; 3種、2019年; 3種、計5種)、非遺伝毒性肝発がん物質 (2018年; 2種、2019年; 5種、計7種)、非遺伝毒性非肝発がん物質 (2018年; 16種、2019年; 8種、計24種) を投与24時間後に肝臓を摘出した。使用した化学物質は図1に示す。

2018年セット (計30化合物)	2019年セット (計28化合物)
<ul style="list-style-type: none"> 遺伝毒性ラット肝発がん物質 (+/+): 9種 o-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (MDA), 4,4'-Thiodianiline (TDA), N-Nitrosodiphenylamine (NDEA), N-Nitrosodiphenylamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), Nitrosodibutylamine (NB), N-Nitrosopyrrolidine (NNP) 遺伝毒性非肝発がん物質 (+/-): 3種 Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT) 非遺伝毒性肝発がん物質 (-/+): 2種 Monocrotaline (MCT), Phenobarbital (PB) 非遺伝毒性非肝発がん物質 (-/-): 16種 Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI), Indomethacin (IM), Phenybutazone (PhB), Promethazine (PMZ), Sulindac (SUL), Tetracycline (TC), Ethionamide (ETH), Theophylline (TEO), Caffeine (CAF), Chloramphenicol (CMP) 	<ul style="list-style-type: none"> 遺伝毒性ラット肝発がん物質 (+/+): 13種 4,4'-Oxydianiline (44-ODA), Auramine-O (AO), Acid Red 26 (Cl-16150)(AR-26), Benzidine (BZ), Dichloroacetic Acid (DCA), Ethylene thiourea (ETU), Hydrazinium Sulfate (HS), Hydrazine (H2), 4,4'-Methylene-bis[2-chloro-aniline](MBOCA), Nitrososeptamethyleneimine (NMI), Retrosine (RTS), Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP), Vinyl Bromide (VB) 遺伝毒性非肝発がん物質 (+/-): 2種 2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene) (DNT), Isonicotinic Acid Hydrazide (INH) 非遺伝毒性肝発がん物質 (-/+): 5種 Carbon Tetrachloride (CCL4), Coumarine (Coumarine), Ethynylestradiol (EE), Gemfibrozil (GFZ), Heachlorobenzene (HCB) 非遺伝毒性非肝発がん物質 (-/-): 8種 Allyl alcohol (AA), Butylated hydroxyanisole (BHA), Chlorpheniramine (CHL), Chlorpropamide (CPR), furasemide (FUR), Methylidopa (MDP), Methimazole (MTZ), Sulfasalazine (SS)
陽性対照 2-Nitropropane (2-NP)	陰性対照 Methyl cellulose (MC)

図1 使用した化学物質

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

次に、得られたデータから、対照群である2-NPおよびMCを除いたデータを用いた。実際に予測モデルを使用する場合では遺伝毒性/肝発がん性の情報がない化学物質に対して実施することを想定して、Leave-One-Out交差検証により予測結果の精度評価を行った。Leave-One-Out交差検証は、ある曝露物質のデータをテスト用とし、他の曝露物質のデータを用いて学習したモデルの精度を評価することを、物質を変えながら繰り返し検証方法であり、毒性が未知の物質に対する予測を模擬した精度評価方法である。この方法を用いて、遺伝毒性、肝発がん性、遺伝毒性/肝発がん性を付加体から予測するモデルを試作した。学習アルゴリズムとしては、ランダムフォレストを使用した。

(倫理面の配慮)

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

C. 研究結果

各種化学物質を投与したラット肝臓DNAのアダクトーム解析を行なった結果を図2に示す。LDA解析を行なったところ、2018データセット単独、2019データセット単独、及び2018+2019データセットのいずれにおいても、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグル

ープに明確に分離されることがわかった。

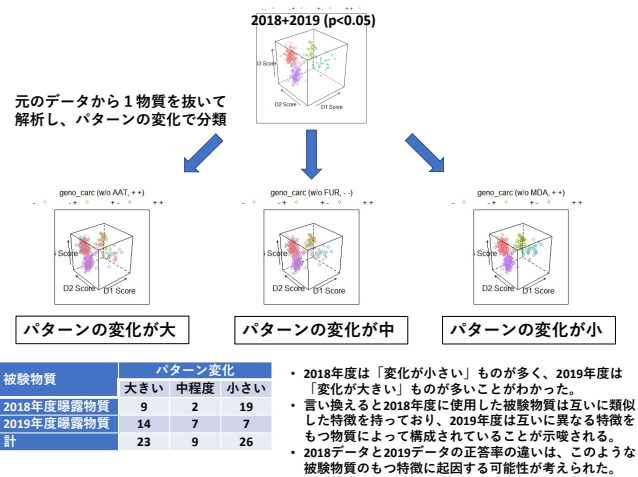


図2 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(LDA解析による)

表2 遺伝毒性の予測結果

データセット	毒性予測モデルの精度評価の比較		
	Geno/Carcino 正解率 (%)	Geno 正解率 (%)	Carcino 正解率 (%)
2018	88	88	94
2019	38	41	60
2018+2019	49	50	65

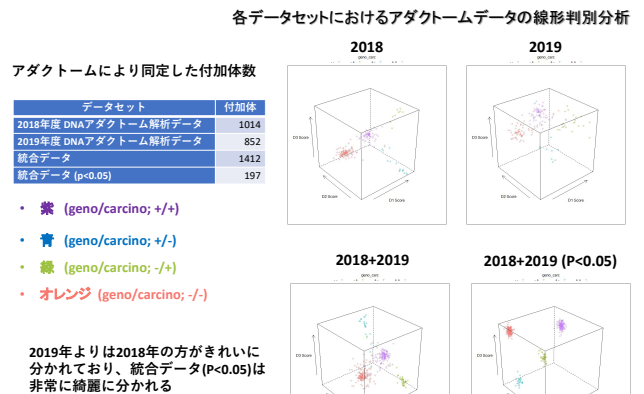


図3 2018+2019統合データセットから1被験物質を除いたLDA解析

Leave-One-Out交差検証により化学物質の遺伝毒性/発がん性を予測するモデルを機械学習手法(ランダムフォレストを使用)を用いて試作した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いて2018+2019統合データセットに対して予測を行ったところ、遺伝毒性/肝発がん性の予測結果は49%、遺伝毒性の予測結果が50%、肝発がん性の予測結果は65%と2018年データセット単独の結果と比べ正答率が低くなった(表2)。これは2019年データセットでの正答率が極端に低いことが大きく影響していると考えられた。

2018+2019統合データセットから1被験物質を除いて

LDA解析を行ない、そのパターンの変化の大・中・小で分類を行なってみたところ、2019年に試験した被験物質に変化の大きなものが多数存在することがわかった(図3)。

D. 考察

HRAM-アダクトームを用いてDNA付加体の網羅解析を行ないLDA解析を行った結果、遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質の4つのグループに分離できた。

これらデータを用いてLeave-One-Out交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、50~65%の正答率となり、2018データセットを単独で用いた場合(88~94%)と比較して精度が低下することがわかった。この結果は、2019年データセット単独での低い正答率が影響していると推測された。2018+2019統合データセットから1被験物質を除いてLDA解析を行ない、そのパターンの変化の大・中・小で分類を行なってみたところ、2019年に試験した被験物質に変化の大きなものが多数存在することがわかった。このことは、2018年度に使用した被験物質は互いに類似した特徴を持っており、2019年度は互いに異なる特徴をもつ物質によって構成されていることが示唆される。2018データと2019データの正答率の違いは、このような被験物質のもつ特徴に起因する可能性が考えられた。今後は、2018+2019統合データセットの正答率向上について更に検討を行う。また、各グループの予測に重要な付加体の探索やアダクトームデータに化学物質構造データを追加するなど予測精度の向上についても検討する。

E. 結論

58種の遺伝毒性/非遺伝毒性非肝発がん物質を投与したラットの肝臓からDNAを抽出し、HRAM-アダクトームを用いてDNA付加体の網羅解析を行なった。得られたデータのLDA解析を行った結果、遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質の4つのグループに分離できた。

これらデータを用いてLeave-One-Out交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、50~65%の正答率となり、2018データセットを単独で用いた場合(88~94%)と比較して精度が低下することがわかった。この結果は、2019年データセット単独での低い正答率が影響していると推測された。2018+2019統合データセットから1被験物質を除いてLDA解析を行ない、そのパターンの変化の大・中・小で分類を行なってみたところ、2019年に試験した被験物質に変化の大きなものが多数存在することがわかった。このことは、2018年度に使用した被験物質は互いに類似した特徴を持っており、2019年度は互いに異なる特徴をもつ物質によって構成されていることが示唆される。2018データと2019データの正答率の違いは、このような被験物質のもつ特徴に起因する可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of

DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.* 2021; 112: 7-15.

- 2) 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, Jantarabekul W, Paitoonpong L, Handley FG, Bernabe KG, 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.* 2021; 555: 71-7.
- 3) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, 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.* 2020; 96: 180-7.
- 4) Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis.* 2020; 41: 368-76.
- 5) 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.* 2020; 42: 16.

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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、Web開催)
- 7) 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、Web開催)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

研究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
該当なし							

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
Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S.	Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin.	Toxicol Lett	336	32-8	2021
Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujitaka M, Gi M, Wongsomchai R, Wanibuchi H.	Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis.	Cancers (Basel)	13		2021
Mori T, Tanaka H, Suzuki S, Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Mori Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M.	Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer.	Cancer Sci	112	1746-57	2021
Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakano K, Komura M, Kato H, Naiki-Ito A, Watanabe K, Nagayasu Y, Hosokawa Y, Takiguchi S, Kasugai K, Kasai K, Inaguma S, Takahashi S.	Kasugai K, Kasai K, Inaguma S, Takahashi S. PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients.	Virchows Arch	(In press; DOI: 10.1007/s00428-021-03062-0)		2021

Yamada T, <u>Toyoda T</u> , Matsushita K, Cho YM, Akagi JI, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K.	Expression of stem cell markers as useful complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for gamma-H2AX.	Arch Toxicol	95	715-26	2021
Yamada T, <u>Toyoda T</u> , Ide T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K.	Neuromuscular and vascular hamartoma of the small intestine in an F344 rat.	J Toxicol Pathol	34	113-7	2021
Tsuda H, Yoshida M, Akiyama F, Ochi Y, Kinowaki K, Kumaki N, Konno Y, Saito A, Sasaki E, Nishimura R, Fujii S, Homma K, Horii R, Murata Y, Itami M, Kajita S, <u>Kato H</u> , Kurosumi M, Sakatani T, Shimizu S, Taniguchi K, Tamiya S, Nakamura H, Kanbayashi C, Shien T, Iwata H.	Nuclear grade and comedo necrosis of ductal carcinoma in situ as histopathological eligible criteria for the Japan Clinical Oncology Group 1505 trial: an interobserver agreement study.	Jpn J Clin Oncol	51	434-43.	2021
Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y.	New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer.	Cancer Sci	112	7-15	2021
Matsuyama N, Naiki T, Naiki-Ito A, Chaya R, Kawaguchi T, Etani T, Nagai T, <u>Kato H</u> , Kubota Y, Yasui T.	Novel case of androgen receptor-positive cancer of unknown primary without serum prostate-specific antigen elevation that became progression free in the long term after primary combined androgen blockade.	IJU Case Rep	4	59-63	2021
Matsushita K, <u>Toyoda T</u> , Yamada T, Morikawa T, Ogawa K.	Specific expression of survivin, SOX9, and CD44 in renal tubules in adaptive and maladaptive repair processes after acute kidney injury in rats.	Journal of applied toxicology	41	607-17	2021

Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Lee W, Tan M, Moir ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildebrandt A, Totsuka Y, Nanbo A, Putchareon O, Suwanpimolkul G, Jantarabanjakul W, Paitoonpong L, Handley FG, Bernabeu KG, 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	71-7	2021
Kato H, Naiki-Itano A, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S.	DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer.	Carcinogenesis	(In press; DOI: 10.1093/carcin/bgab017)		2021
Nishikawa S, Uemoto Y, Kim TS, Hisada T, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Dong Y, Sugiyama H, Okuda K, Kato H, Osaga S, Takahashi S, Toyama T.	Low RAI2 expression is a marker of poor prognosis in breast cancer. Breast Cancer Res Treat.	Cancer Res Treat	187	81-93	2021
Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, 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	180-7	2020
Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani T.	Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-resistant bladder cancer.	Cancer Lett	479	89-99	2020

Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogasawara K, Takahashi S, Wanibuchi H.	Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats.	J Toxicol Pat	33	279-85	2020
Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S.	Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the association with prognosis and treatment.	PLoS One	15	e0238120	2020
Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H.	Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis.	Int J Mol Sci	21		2020
Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H.	Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model.	Arch Toxicol	94	927-37	2020
Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Matsuda Y, Imaida K.	Lung proliferative lesion-promoting effects of left pulmonary ligation in A/J female mice.	Pathol Int	70	340-7	2020
Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S.	Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Tumor Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism.	Nutrients	12		2020

Uemoto Y, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Asano T, Hirasada T, Nishikawa S, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Okuda K, Sugimura H, Kato H, Takahashi S, Toyama T.	Sentinel lymph node biopsy may be unnecessary for ductal carcinoma in situ of the breast that is small and diagnosed by preoperative biopsy.	Jpn J Clin Oncol	50	1364-9	2020
Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S.	Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo.	Toxicology	429	152325	2020
Nozaki S, Naiki T, Naiki-Ito A, Iwatsuki S, Takeuchi T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T.	Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis.	Andrology	8	1895-906	2020
Nakano-Narusawa Y, Yokohira M, Yamakawa K, Saotome K, Imaida K, Matsumura Y.	Single Intratracheal Quartz Instillation Induced Chronic Inflammation and Tumorigenesis in Rat Lungs.	Sci Rep	10	6647	2020
Nakanishi H, Sawada T, Kaizaki Y, Ota R, Suzuki H, Yamamoto E, Aoki H, Eizuka M, Hasatani K, Takahashi N, Inagaki S, Ebi M, Kato H, Kubota E, Kataoka H, Takahashi S, Tokino T, Minamoto T, Sugai T, Sasaki Y.	Significance of gene mutations in the Wnt signaling pathway in traditional serrated adenomas of the colon and rectum.	PLoS One	15	e0229262	2020

Naiki-Ito A, Naiki T, <u>Kato H</u> , Iida K, Etani T, Nagayasu Y, <u>Suzuki S</u> , Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S.	Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer.	Carcinogenesis	41	1145-57	2020
Naiki-Ito A, <u>Kato H</u> , Naiki T, Yeh R, Aoyama Y, Nagayasu Y, <u>Suzuki S</u> , Inaguma S, Takahashi S.	A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats.	Arch Toxicol	94	4085-97	2020
Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, <u>Totsuka Y</u> , Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K.	Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multiple lesion mutational profiles.	Carcinogenesis	41	368-76	2020
Mapoung S, <u>Suzuki S</u> , Fuji S, Naiki-Ito A, <u>Kato H</u> , Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlanporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P.	Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo.	Molecules	25		2020
Kishi S, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Kanie S, Hashimoto N, Saito K, <u>Yokohira M</u> , Imaida K, Matsuda Y.	Preexisting diabetes mellitus had no effect on the no-observed-adverse-effect-level of acetaminophen in rats.	J Toxicol Sci	45	151-62	2020
Kawanishi M, Yoneda R, <u>Totsuka Y</u> , Yagi T.	Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts.	Genes Environ	42	16	2020

Kato T, Matsuo Y, Ueda G, Aoyama Y, Omi K, Hayashi Y, Imafuji H, Saito K, Tsuboi K, Morimoto M, Ogawa R, Takahashi H, <u>Kato H</u> , Yoshida M, Naitoh I, Hayashi K, Takahashi S, Takiguchi S.	Epithelial cyst arising in an intrapancreatic accessory spleen: a case report of robotic surgery and review of minimally invasive treatment.	BMC Surg	20	263	2020
<u>Kato H</u> , Naiki-Ito A, Yamada T, <u>Suzuki S</u> , Yamashita Y, Inaguma S, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Toyama T, Takahashi S.	The standard form of CD44 as a marker for invasion of encapsulated papillary carcinoma of the breast.	Pathol Int	70	835-43	2020
Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, <u>Suzuki S</u> , <u>Kato H</u> , Nozaki S, Nagai T, Etani T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S.	Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway.	Cancer Sci	111	1165-79	2020

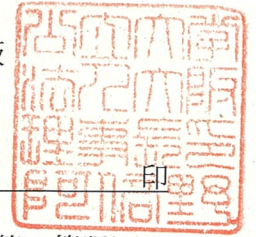
令和3年3月31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人大阪

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 西澤 良記



次の職員の令和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 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 大阪市立大学大学院医学研究科・教授
(氏名・フリガナ) 鰐淵 英機 (ワニブチ ヒデキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	大阪市立大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input 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31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人大阪

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 西澤 良記



次の職員の令和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 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 大阪市立大学大学院医学研究科・准教授
(氏名・フリガナ) 鈴木 周五 (スズキ シュウゴ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	大阪市立大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input 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31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人大阪

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 西澤 良記



次の職員の令和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 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 大阪市立大学大学院医学研究科・准教授
(氏名・フリガナ) 魏 民 (ギ ミン)

4. 倫理審査の状況

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

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広 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、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・室長
(氏名・フリガナ) 豊田 武士 ・ トヨダ タケシ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、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1月25日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人香川大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 寛 善行



次の職員の令和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 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 香川大学医学部腫瘍病理学・准教授
(氏名・フリガナ) 横平 政直・ヨコヒラ マサナオ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、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 31 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人名古屋市立大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 郡 健二郎



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 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 名古屋市立大学 大学院医学研究科・助教
(氏名・フリガナ) 加藤 寛之 (カトウ ヒロユキ)

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

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

次の職員の令和 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 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 研究所 がんモデル開発部門・ユニット長
(氏名・フリガナ) 戸塚ゆ加里・トツカユカリ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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