

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3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鱒淵 英機

令和4年(2022)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	----- 11
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	----- 15
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	----- 18
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	----- 22
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	----- 26
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	----- 30
魏 民	
7. DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価	----- 33
戸塚ゆ加里	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 37

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試験法確立を目指し、本年度は優先評価化学物質5つを含む非遺伝毒性肝発がん物質19種類と、非発がん物質1種類の合計20種について検討した。その結果、従来モデルでは感度42%、特異度100%と判定された。感度の改善のため、低用量でも発がん物質を陽性と判定する予測モデルとして、新規・高感受性モデルを開発および検討した結果、感度84%(16/19物質)と感度の改善を認めた。高感受性モデルは、これまでの検討した化学物質79物質において、感度69%、特異度85%、正答率が79%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。今後、より高い感度とともに、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。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、これまでの検討において、陰性と判定された遺伝毒性陽性であるが発がん性不明の「監視化学物質」1種類及び偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質の3種類について投与用量を上げて検討した。その結果、4種類すべて陰性と判定された。これまでに実施した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%及び特異度95%と、高い精度で検出可能である。今後、更なる精度向上のため、偽陰性になった遺伝毒性肝発がん物質についても検出できる補完モデルの開発を行い、本モデルと組み合わせることで、より精度の高い総合的な予測モデルの開発を行う。さらに、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルで、各物質投与後に採取した肝組織からDNAを抽出し、HRAM-アダクトームを用いてDNA付加体の網羅的解析を行った。線形判別分析(LDA)解析により、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。また、学習アルゴリズムを従来のランダムフォレストからLDAに変更しモデル作成を行った結果、正答率が改善された。

### 研究分担者

横平政直 香川大学医学部 医学教育学 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 講師  
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 日本大学薬学部 環境衛生学 教授

### 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に対する試験法」について、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化学物質について検討し、従来法で感度27%(3/11物質)、特異度100%(5/5)の結果が得られた。新規・14遺伝子モデルでは、感度45%(5/11物質)、特異度100%(5/5)の結果が得られた。令和3年度は、非遺伝毒性肝発がん物質かつ「優先評価化学物質」である5つの化学物質を含む合計20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)。

「遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」について、令和2年度は、遺伝毒性発がん物質の検出に本モデルの有用性が確認された一方で、偽陰性を示す物質が認められた。令和3年度では、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」1種類及び偽陰性になった遺伝毒性肝発がん物質3種類について、投与用量を上げて再検討を実施した(大阪市立大/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を用いた予測モデルの改善を試みた(日本大学/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、優先評価化学物質かつ非遺伝毒性肝発がん物質である5物質含む、非遺伝毒性肝発がん物質19種および非発がん物質1種の合計20物質について検討した。また、感度の向上を目指し、昨年度の一部物質について投与用量及び投与方法を変更して検討した。発がん物質は、過去の文献上で4週間投与時に最大投与量と推察される量を投与した。

大阪市立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質6種:Thioacetamide(TAA; 45 mg/kg/day)、Phenobarbital, sodium(PB; 100 mg/kg/day)、Methyl carbamate(MCB; 500 mg/kg/day)、1,4-Dioxane(1,4-D; 1000 mg/kg/day)、Methyleugenol(MEG; 250 mg/kg/day)、2-Nitrotoluene(2NT; 300 mg/kg/day)を強制胃内投与した。

香川大学担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質4種:Chlorendic acid(CRA; 5 g/kg)、N,N-Dimethylformamide(DMF; 5 g/kg)、Bis(2-ethylhexyl)Phthalate(DEHP; 50 g/kg)を混餌投与、Poly(hexamethylenebiguanide)hydrochloride(PHMB; 2→1g/kg)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5種:Clofibrate(CF; 300 mg/kg/day)、Hexachlorobenzene(HCB; 300 mg/kg/day)、Wy-14643(WY; 100 mg/kg/day)、Chlorobenzene(CB; 250 mg/kg/day)およびFuran(30 mg/kg/day)を強制胃内投与した。

名古屋市立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質4種:dl-Ethionine(DL-ET; 200 mg/kg/day)、Doxylamine succinate(DOX; 200 mg/kg/day)、Methapyrilene hydrochloride(MP; 100 mg/kg/day)、Nitrobenzene(NB; 125→62.5 mg/kg/day)および非肝発がん物質1種:Hexachlorophene(HCP; 20 mg/kg/day)を強制胃内投与した。

このうち、TAA、PB、1,4-D、CFB、CRA、DL-ET、DOX、HCPについては、前年度に行った化学物質で28日間の最大投与量かつ強制胃内投与方法を用いて再検討した。

肝臓からRNeasy mini kit(キアゲン)を用いてtotal RNAを抽出・精製し、GeneChip® Clarion 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(従来モデル)。

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 $\alpha$ 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(14遺伝子モデル)。

さらに、発がん物質検出感度を改善するため、新規予測モデルで用いた14遺伝子について、従来はがん原性試験で50%に腫瘍発生を認める投与量(TD50)以上を、判定陽性とする予測モデルを構築していたが、低用量においても判定を陽性として新たに予測モデルを再構築した(高感受性モデル)。

### 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ラットに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用量は表1に示す。

判定対象物質として、令和2年度に、陰性と判定された4物質(監視対象化学物質であるDisperse Blue 134(DB-134)、優先評価化学物質である*o*-phenylenediamine(OPD)、既知の遺伝毒性肝発がん物質であるSafrole及び1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone(ADBAQ))を用いた。DB-134及びADBAQの投与用量を令和2年度の1000 mg/kgからOECD TG420急性経口毒性試験において定められている最高用量の2000 mg/kgに上げた。OPDの投与用量を令和2年度の170 mg/kg(1/3 of LD50)から340 mg/kg(2/3 of LD50)及び510 mg/kg(LD50)に、Safroleの投与用量を令和2年度の650 mg/kg(1/3 of LD50)から1300 mg/kg(2/3 of LD50)と1950 mg/kg(LD50)にそれぞれ上げた。なお、溶媒対照群(対照群)として0.5% Methyl cellulose(MC)投与群を設けた。



被験物質投与後 24 時間後に剖検を行い、肝臓を摘出した。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、液体窒素で凍結後、-80℃で凍結保管した(1 本は DNA adduct 解析用)。病理組織学検討サンプルとして、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%中性緩衝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 抽出及び cDNA の合成はそれぞれ RNeasy mini kit (キアゲン) 及び 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。

表 1. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法で検討した化学物質

投与物質	分類	LD50 (mg/kg)	投与用量 (mg/kg)
DB-134 監視化学物質	遺伝毒性+ 「発がん性不明」	不明	2000*
OPD 優先評価化学物質	遺伝毒性+ 肝発がん物質	510	340# 510###
Safrole	遺伝毒性+ 肝発がん物質	1950	1300# 1950###
ADBAQ	遺伝毒性+ 肝発がん物質	不明	2000*
0.5% MC	溶媒 (陰性対照物質)		

\*OECD TG420急性経口毒性試験において定められている最高用量

#LD50の1/3に相当する用量

###LD50に相当する用量

### 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。

DNA を抽出後、DNaseI、ヌクレアーゼ P1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオチドに消化した後、LC-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。また、今年度は予測精度向上のために、2018 年および 2019 年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し(表 1 参照)、HRAM-アダクトームの再分析を実施した。得られたデータを線形判別分析(LDA)により解析した。

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"> <li>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-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine (NENMA), Nitrosodibutylamine (NB), N-Nitrosopyrrolidine (NNP)</li> <li>遺伝毒性非肝発がん物質 (+/-): 3種 Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT)</li> <li>非遺伝毒性肝発がん物質 (-/+): 2種 Monocrotaline (MCT), Phenobarbital (PB)</li> <li>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), Triantennene (TRI), Indomethacin (IM), Phenylbutazone (PhB), Promethazine (PMZ), Sulindac (SUL), Tetracycline (TC), Ethionamide (ETH) Theophylline (TEO), Caffeine (CAF), Chloramphenicol (CMP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>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 (HZ), 4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline)(MBOCA), Nitrosoheptamethyleneimine (NHMI), Retrosine (RTS), Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP), Vinyl Bromide (VB)</li> <li>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)</li> <li>非遺伝毒性肝発がん物質 (-/+): 5種 Carbon Tetrachloride (CCL4), Coumarine (Coumarine), Ethynylestradiol (EE), Gemfibrozil (GFZ), Hexachlorobenzene (HCB)</li> <li>非遺伝毒性非肝発がん物質 (-/-): 8種 Allyl alcohol (AA), Butylated hydroxyanisole (BHA), Chlorpheniramine (CHL), Chlorpropamide (CPP), Furosemide (FUR), Methyldopa (MDP), Methimazole (MTZ), Sulfasalazine (SS)</li> </ul>

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

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には遺伝毒性/肝発がん性の情報がない化学物質に対して実施することを想定して、Leave-One-Out 交差検証により予測結果の精度評価を行った。Leave-One-Out 交差検証は、ある曝露物質のデータをテスト用とし、他の曝露物質のデータを用いて学習したモデルの精度を評価することを、物質を変えながら繰り返す検証方法であり、毒性が未知の物質に対する予測を模擬した精度評価方法である。この方法を用いて、今年度はこれまでの遺伝毒性、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ではなく、毒性ラベルが「++」と「--」または「++」と「それ以外」に分けて予測精度の向上について検討した。学習アルゴリズムとしては、ランダムフォレスト (RF) と線形判別分析 (LDA) 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(鰐淵、横平、豊田、加藤、鈴木)

動物実験経過中、PHMB 群において実験開始 1 週目に著明な体重減少が見られたため、以降は用量を 2g/kg から 1g/kg へ減量して投与することとした。投与開始後 3 週目以降、HCB 投与群の 2 匹が投与前後に振戦を呈し、25 日目に斃死した。MPH 群は、17 および 28 日目に 1 匹ずつ投与直後に全身痙攣を起こして死亡した。NB 群は 9 日目において 2 匹にメトヘモグロビン血症と考えられる麻痺が出現し、10 日目に 1 匹死亡したため、1 日の休薬後投与量を半量(62.5 mg/kg/day)に変更した。

各物質を4週間投与後に屠殺・剖検した際に、TAA、MCB、2NT、DEHP、WY、CB、Furan、MP、DL-ET、NB群で有意な体重増加抑制を認めた。また、肝重量は、DEHP、CF、HCB、WY、Furan投与により、絶対及び相対肝重量が有意に増加した。MP、DL-ET投与により、絶対肝重量が有意に低下した。TAA、PB、1,4-D、2NT、CB、DOX、NB、HCP投与により相対肝重量が有意に増加した。採取された肝組織について検討した結果、TAA、PB、1,4-D、2NT、DMF、DEHP、CF、HCB、WY、CB、Furan、MP、DL-ET群において肝細胞肥大や空胞変性などの組織学的変化を認めた。また、MEG、CRA、PHMB、DOX、NB群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。

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。その結果、非遺伝毒性肝発がん物質19物質のうち8物質(42%)が発がん物質として判定された。一方、非発がん物質HCPについては陰性と判定されている。以上より今年度の正答率は45%だった(表2)。

表2. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果(従来モデル)

施設	投与物質	略名	発がん性	投与方法・量	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	陽性	45 mg/kg ig	陽性	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	500 mg/kg ig	陰性	×
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	1000 mg/kg ig	陰性	×
	Methyleugenol	MEG	陽性	250 mg/kg ig	陰性	×
	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	300 mg/kg ig	陰性	×
香川大	Chlorendic acid	CRA	陽性	5 g/kg diet	陰性	×
	N,N-Dimethylformamide	DMF	陽性	10 g/kg diet	陰性	×
	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	陽性	50 g/kg diet	陽性	○
	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	PHMB	陽性	2 g/kg drink	陰性	×
	Clofibrate	CF	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
国立衛試	Hexachlorobenzene	HCB	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
	Wy-14643	WY	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Chlorobenzene	CB	陽性	250 mg/kg ig	陰性	×
	Furan	Furan	陽性	30 mg/kg ig	陰性	○
	di-Ethionine	DL-ET	陽性	200 mg/kg ig	陰性	×
名市大	Doxylamine succinate	DOX	陽性	200 mg/kg ig	陰性	×
	Methapyriene hydrochloride	MP	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Nitrobenzene	NB	陽性	125 mg/kg ig	陰性	×
	Hexachlorophene	HCP	陰性	20 mg/kg ig	陰性	○

一方、新規・14遺伝子モデルを用いた解析における非遺伝毒性肝発がん物質の検出を行った結果を表3に示す。遺伝毒性肝発がん物質19物質のうち12物質(63%)が発がん物質として判定された。非発がん物質HCPについては陰性と判定されている。以上より今年度の正答率は65%だった。

昨年度の非遺伝毒性発がん物質の一部について、投与方法を強制胃内投与に変更した結果、従来モデルおよび14遺伝子モデルいずれも1物質陽性判定が増え、感度は上昇したものの大きな改善はされなかった(表4,5)。そこで、より感度を改善するため、発がん物質をTD50以下の低用量でも検出できるモデルとして、高感受性モデルを開発し検討した結果、非遺伝毒性肝発がん物質19物質のうち16物質(84%)が発がん物質として判定された。一方、非発がん物質HCPについては陽性と判定されている。以上より今年度の正答率は80%だった(表6)。

表3. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果(14遺伝子モデル)

施設	投与物質	略名	発がん性	投与方法・量	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	陽性	45 mg/kg ig	陽性	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	500 mg/kg ig	陰性	×
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	1000 mg/kg ig	陰性	×
	Methyleugenol	MEG	陽性	250 mg/kg ig	陽性	○
	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
香川大	Chlorendic acid	CRA	陽性	5 g/kg diet	陽性	○
	N,N-Dimethylformamide	DMF	陽性	5 g/kg diet	陰性	×
	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	陽性	50 g/kg diet	陽性	○
	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	PHMB	陽性	2 g/kg drink	陰性	×
	Clofibrate	CF	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
国立衛試	Hexachlorobenzene	HCB	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
	Wy-14643	WY	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Chlorobenzene	CB	陽性	250 mg/kg ig	陰性	×
	Furan	Furan	陽性	30 mg/kg ig	陽性	○
	di-Ethionine	DL-ET	陽性	200 mg/kg ig	陰性	×
名市大	Doxylamine succinate	DOX	陽性	200 mg/kg ig	陽性	○
	Methapyriene hydrochloride	MP	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Nitrobenzene	NB	陽性	125 mg/kg ig	陰性	×
	Hexachlorophene	HCP	陰性	20 mg/kg ig	陰性	○

表4. 投与方法および投与濃度変更による発がん性判定結果(従来モデル)

投与物質	略名	発がん性	令和2年		令和3年			
			投与方法・量	判定	成否	投与方法・量	判定	成否
Thioacetamide	TAA	陽性	0.5g/kg diet	陽性	○	45 mg/kg ig	陽性	○
Phenobarbital, sodium	PB	陽性	0.5g/L drink	陰性	×	100 mg/kg ig	陽性	○
Chlorendic acid	CRA	陽性	1.25g/kg diet	陰性	×	5 g/kg diet	陰性	×
Clofibrate	CF	陽性	5g/kg diet	陽性	○	300 mg/kg ig	陽性	○
di-Ethionine	DL-ET	陽性	1g/kg diet	陰性	×	200 mg/kg ig	陰性	×
Doxylamine succinate	DOX	陽性	2g/kg diet	陰性	×	200 mg/kg ig	陰性	×
Hexachlorophene	HCP	陰性	0.15g/kg diet	陰性	○	20 mg/kg ig	陰性	○
1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	5g/L drink	陰性	×	1000 mg/kg ig	陰性	×

表5. 投与方法および投与濃度変更による発がん性判定結果(14遺伝子モデル)

投与物質	略名	発がん性	令和2年		令和3年			
			投与方法・量	判定	成否	投与方法・量	判定	成否
Thioacetamide	TAA	陽性	0.5g/kg diet	陽性	○	45 mg/kg ig	陽性	○
Phenobarbital, sodium	PB	陽性	0.5g/L drink	陽性	○	100 mg/kg ig	陽性	○
Chlorendic acid	CRA	陽性	1.25g/kg diet	陽性	○	5 g/kg diet	陽性	○
Clofibrate	CF	陽性	5g/kg diet	陽性	○	300 mg/kg ig	陽性	○
di-Ethionine	DL-ET	陽性	1g/kg diet	陰性	×	200 mg/kg ig	陰性	×
Doxylamine succinate	DOX	陽性	2g/kg diet	陰性	×	200 mg/kg ig	陽性	○
Hexachlorophene	HCP	陰性	0.15g/kg diet	陰性	○	20 mg/kg ig	陰性	○
1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	5g/L drink	陰性	×	1000 mg/kg ig	陰性	×

表6. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果(高感受性モデル)

施設	投与物質	略名	発がん性	投与方法・量	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	陽性	45 mg/kg ig	陽性	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	500 mg/kg ig	陽性	○
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	1000 mg/kg ig	陽性	○
	Methyleugenol	MEG	陽性	250 mg/kg ig	陽性	○
	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
香川大	Chlorendic acid	CRA	陽性	5 g/kg diet	陽性	○
	N,N-Dimethylformamide	DMF	陽性	5 g/kg diet	陰性	×
	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	陽性	50 g/kg diet	陽性	○
	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	PHMB	陽性	2 g/kg drink	陰性	×
	Clofibrate	CF	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
国立衛試	Hexachlorobenzene	HCB	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
	Wy-14643	WY	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Chlorobenzene	CB	陽性	250 mg/kg ig	陽性	○
	Furan	Furan	陽性	30 mg/kg ig	陽性	○
	di-Ethionine	DL-ET	陽性	200 mg/kg ig	陽性	○
名市大	Doxylamine succinate	DOX	陽性	200 mg/kg ig	陽性	○
	Methapyriene hydrochloride	MP	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Nitrobenzene	NB	陽性	125 mg/kg ig	陰性	×
	Hexachlorophene	HCP	陰性	20 mg/kg ig	陽性	×

これまで検証した全ての79化学物質について、各モデルにおける感度、特異度および正答率を表7にまとめた。従来モデルに比べ、14遺伝子モデルは感度が高く特異度も遜色なく正答率も80%以上認める優秀なモデルではあるが、感度が60%以下と問題点が存在する。今年度作成した高感受性モデルは、感度が約70%と現行モ

デルから大幅な改善を認める優秀なモデルである一方で、特異度が下がっており改善が望まれる。

表7. これまでに検討した79物質の予測モデルごとの成績

予測モデル	従来モデル	14遺伝子モデル	高感受性モデル
感度	41% (13/32)	56% (18/32)	69% (22/32)
特異度	100% (47/47)	98% (46/47)	85% (40/47)
正答率	76% (60/79)	81% (64/79)	79% (62/79)

## 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 (鱒淵、魏)

qPCRで取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った。本モデルでは、遺伝毒性ラット肝発がん物質を「陽性」、その他の物質(非遺伝毒性ラット肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質)を「陰性」と判定する。その結果、本年度に検討した4物質はすべて「陰性」と判定された。

## 3. DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価 (鱒淵、戸塚)

2018年および2019年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し、今年度HRAM-アダクトームの再分析を実施した結果を図2に示す(2021データ)。LDA解析を行なったところ、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。

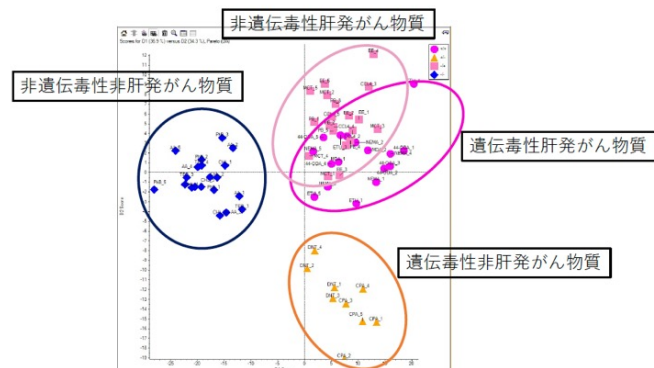


図2. 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(LDA解析による)

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2021年データセットに対して予測を行ったところ、予測結果が低いことがわかった(表8)。そこで、毒性予測モデルの正答率向上に向け、これまでモデル作成に用いてきたランダムフォレスト(RF)ではなく、線形判別分析(LDA)を用い、かつ毒性予測モデルの実用性の観点から遺伝毒性・発がん性ともに陰性の物質を予測できればよいのではないかと考え、毒性ラベルを再構成した予測モデルの検討を実施した。その結果、学習アルゴリズムについてはRF、LDA

の正答率は殆ど同じか若干LDAの方が良く、毒性ラベルが「++」と「--」のみの物質を使用した場合には、2018年度測定データで約100%、2019年度測定データで54-73%、2021年度測定データで65-89%となり、いずれもラベル変更前のデータより10-30%増加した(表9)。

表8. 遺伝毒性の予測結果

物質名	ラベル	測定年度	正答数	回答数	正答率	予測++	予測+-	予測-+	予測--
AA	--	2019	4	5	0.8	0	0	1	4
CHL	--	2019	4	5	0.8	0	0	1	4
PhB	--	2018	5	5	1	0	0	0	5
TEO	--	2018	5	5	1	0	0	0	5
CCL4	--	2019	3	5	0.6	2	0	3	0
EE	--	2019	5	5	1	0	0	5	0
MCT	--	2018	1	5	0.2	2	0	1	2
PB	--	2018	0	5	0	1	0	0	4
CPA	--	2018	0	5	0	0	0	4	1
DNT	--	2019	0	4	0	2	0	1	1
44-ODA	--	2019	2	5	0.4	2	0	3	0
ETU	--	2019	0	5	0	0	0	4	1
M DA	--	2018	1	2	0.5	1	0	1	0
NEM A	--	2018	1	5	0.2	1	0	4	0
合計			31	66	0.47				

表9. 毒性ラベルを「++」と「--」に限定した場合の平均的な正答率

学習アルゴリズム	2018年度データ		2019年度データ		2021年度データ	
	物質毎	サンプル毎	物質毎	サンプル毎	物質毎	サンプル毎
RF	0.98	0.99	0.54	0.72	0.65	0.76
LDA	0.97	0.98	0.58	0.73	0.73	0.89

一方、毒性ラベルを「--」と「それ以外」に置き換えた場合では、2018年度測定データでおおよそ100%に達し、2019年度測定データで66-76%、2021年度測定データで74-95%となり、いずれもラベル変更前のデータより10-50%増加した(表10)。

表10. 毒性ラベルを「--」と「それ以外」に限定した場合の平均的な正答率

学習アルゴリズム	2018年度データ		2019年度データ		2021年度データ	
	物質毎	サンプル毎	物質毎	サンプル毎	物質毎	サンプル毎
RF	1.00	1.00	0.66	0.76	0.74	0.76
LDA	0.97	0.97	0.70	0.73	0.91	0.95

## D. 考察

非遺伝毒性肝発がん物質の検出法開発において、非遺伝毒性肝発がん物質かつ「優先評価化学物質」である5つの化学物質を含む合計20化学物質について検討した。従来モデルでは感度が19物質のうち8物質検出(42%)と低い結果となり、14遺伝子モデルでも19物質のうち12物質検出(63%)と改善されているものの6割程度と、より高い感度のモデル構築が望まれる結果となった。

また、昨年度に2年間がん原試験の投与用量で混餌もしくは飲水投与した物質について、28日間の最大投与量かつ強制胃内投与方法を用いて再検討した結果、それぞれ1化学物質陽性判定が増えたものの、大きな改善には至らなかった。がん原試験による発がん用量と28日間の最大投与量では用量が異なるものの、大半の物質においては予測モデルで検出するのに必要な用量が投与されていると推察される。

そこで、より感度の高い予測モデルとして高感受性

モデルを開発し、今年度の化学物質において8割以上を、全体としても7割程度の感度を認める改善されたモデルが作成できた。一方で、特異度が85%と従来のモデルに比べ低下しており、改善する必要がある。今後も、より高い感度とともに、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。

遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法については、遺伝毒性陽性で発がん性不明の「監視化学物質」DB-134はOECD TG420 急性経口毒性試験において定められている最高用量の2000 mg/kgにおいても「陰性」と判定されたことから、遺伝毒性非肝発がん物質である可能性が示唆された。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ことが示された。一方、遺伝毒性肝発がん物質であるOPD、Safrole及びADBAQが2000 mg/kgあるいはLD50用量においても、「陰性」と判定されたことから、本モデルの検出力に限界がある可能性が示された。今後は本モデルの限界についての検証を引き続き行うと同時に、偽陰性になった遺伝毒性肝発がん物質についても検出できる補完モデルの開発を行い、本モデルと組み合わせることで、より精度の高い総合的な予測モデルの開発を行う。

DNAアダクトーム解析による遺伝毒性評価において、今年度は、2018年および2019年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し、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。また、学習アルゴリズムを従来のランダムフォレスト (RF) から、線形判別分析 (LDA) に変更しモデル作成を行った結果、正答率が大きく改善された。今後は、更なる正答率向上について検討を行うとともに、正答率に大きく影響する要因について検討する。また、各グループの予測に重要な付加体の探索など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モデルは、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。今年度は、投与方法や投与量による正答率の変化を検討するとともに、高感受性モデルを作成し感度の改善が確認出来た。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、今後も本モデル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短期検出モデルは、遺伝毒性肝発がん物質を高い精度で検出できる可能性が示唆された。今後は本モデルの限界について検証を引き続き行うと同時に、検出感度をさらに高めるため、補完モデルの開発を行い、本モデルと組み合わせることで、より精度の高い総合的な予測モデルの開発を行う。

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遺伝毒性・肝発がん性への分類、遺伝毒性及び肝発がん性の予測が可能となる結果

を示した。線形判別分析を用いたモデル開発で正答率の改善を確認し、精度の高い毒性予測モデルの構築が期待出来る。

## F. 健康危険情報

今回の研究において得られた成果の中で、健康危険情報に該当する情報は得られなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Suzuki S, Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. *J Toxicol Pathol.* 2022. In press.
- 2) Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment. *PLoS One.* 2022; 17: e0263895.
- 3) Wanifuchi-Endo Y, Kondo N, Dong Y, Fujita T, Asano T, Hisada T, Uemoto Y, Nishikawa S, Katagiri Y, Kato A, Terada M, Sugiura H, Okuda K, Kato H, Takahashi S, Toyama T. Discovering novel mechanisms of taxane resistance in human breast cancer by whole-exome sequencing. *Oncol Lett.* 2022; 23: 60.
- 4) Saleh DM, Luo S, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Gunasekaran S, El-Gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohnishi M, Tomono S, Hady R, Fukamachi K, Kanno J, Hirose A, Xu J, Suzuki S, Naiki-Ito A, Takahashi S, Tsuda H. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Part Fibre Toxicol.* 2022; 19: 30.
- 5) Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing *Escherichia coli*, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer. *In Vivo.* 2022; 36: 628-34.
- 6) Asano G, Miyabe K, Kato H, Yoshida M, Sawada T, Okamoto Y, Sahashi H, Atsuta N, Kachi K, Kato A, Jinno N, Natsume M, Hori Y, Naitoh I, Hayashi K, Matsuo Y, Takahashi S, Suzuki H, Kataoka H. Relevance of gene mutations and methylation to the growth of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms

- based on pyrosequencing. *Sci Rep.* 2022; 12: 419.
- 7) Akane H, Toyoda T, Mizuta Y, Cho YM, Ide T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats. *J Appl Toxicol.* 2022. In press.
  - 8) Yokohira M, Oshima M, Yamakawa K, Ye J, Nakano-Narusawa Y, Haba R, Fukumura Y, Hirabayashi K, Yamaguchi H, Kojima M, Okano K, Suzuki Y, Matsuda Y. Adequate tissue sampling for the assessment of pathological tumor regression in pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2021; 11: 6586.
  - 9) Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharm.* 2021; 595: 120241.
  - 10) 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.
  - 11) Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-(1-menthoxy)ethanol in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2021; 34: 309-17.
  - 12) Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.* 2021; 112: 7-15.
  - 13) Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, Totsuka Y, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. *In Vivo.* 2021; 35: 2107-14.
  - 14) Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2021; 259: 3127-36.
  - 15) 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.
  - 16) Subhawa S, Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Komura M, Nagano-Matsuo A, Yeewa R, Inaguma S, Chewonarin T, Banjerdpongchai R, Takahashi S. Suppressive Effect and Molecular Mechanism of *Houttuynia cordata* Thunb. Extract against Prostate Carcinogenesis and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers (Basel).* 2021; 13.
  - 17) Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H. Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability. *Cell Rep.* 2021; 37: 109988.
  - 18) 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.
  - 19) Nakano-Narusawa Y, Yokohira M, Yamakawa K, Ye J, Tanimoto M, Wu L, Mukai Y, Imaida K, Matsuda Y. Relationship between Lung Carcinogenesis and Chronic Inflammation in Rodents. *Cancers (Basel).* 2021; 13.
  - 20) 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; 479: 277-84.
  - 21) 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.
  - 22) 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.



- 23) Matsushita K, Takasu S, Ishii Y, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. In vivo mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of gpt delta rats. Arch Toxicol. 2021; 95: 3117-31.
- 24) Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y. Establishment of Novel Genotoxicity Assay System Using Murine Normal Epithelial Tissue-Derived Organoids. Front Genet. 2021; 12: 768781.
- 25) Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N(4)-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. Chem Res Toxicol. 2021; 34: 912-9.
- 26) Kawata K, Baba A, Shiota M, Wanibuchi H, Baba Y. ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. J Biochem. 2021; 170: 483-8.
- 27) 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; 42: 940-50.
- 28) Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. Cancers (Basel). 2021; 13: 3613.
- 29) 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.
- 30) Kachi K, Kato H, Naiki-Ito A, Komura M, Nagano-Matsuo A, Naitoh I, Hayashi K, Kataoka H, Inaguma S, Takahashi S. Anti-Allergic Drug Suppressed Pancreatic Carcinogenesis via Down-Regulation of Cellular Proliferation. Int J Mol Sci. 2021; 22.
- 31) Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, Suzuki S, Yabata H, Koizumi R, Moriyoshi H, Yazawa I. Selective extension of cerebral vascular calcification in an autopsy case of Fahr's syndrome associated with asymptomatic hypoparathyroidism. Neuropathology. 2021; 41: 387-95.
- 32) Isobe T, Naiki T, Naiki-Ito A, Kawai T, Etani T, Nagai T, Nozaki S, Kobayakawa Y, Iwatsuki S, Matsuyama N, Kato H, Kawai N, Yasui T. Rare case of immunoglobulin G4-related disease arising in gonadal glands with long-term remission without steroid treatment: Discussion and literature review. IJU Case Rep. 2021; 4: 188-91.
- 33) Aoyama Y, Naiki-Ito A, Xiaochen K, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Inaguma S, Tsuda H, Tomita M, Matsuo Y, Takiguchi S, Takahashi S. Lactoferrin Prevents Hepatic Injury and Fibrosis via the Inhibition of NF-kappaB Signaling in a Rat Non-Alcoholic Steatohepatitis Model. Nutrients. 2021; 14.
2. 学会発表
- 1) 鈴木周五、魏民、鰐淵英機. Luteolinによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第110回日本病理学会総会、東京 (2021年4月)
- 2) 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智. エラグ酸の膵発癌抑制効果の検討. 第110回日本病理学会総会、東京 (2021年4月)
- 3) 山本栄一、高橋祐次、栗形麻樹子、齊藤洋克、松下幸平、豊田武士、佐藤太、北嶋聡、小川久美子、伊豆津健一、斎藤嘉朗、平林容子、飯村康夫、本間正充、奥田晴宏、合田幸広. 脱離エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析イメージングによるシクレソニドの1 μm エアロゾル吸入後のラット肺におけるシクレソニドとその代謝物の空間的局在の可視化. 日本薬剤学会第36年会、Web開催 (2021年5月)
- 4) 戸塚ゆ加里. 質量分析機器を用いたDNA付加体の網羅的解析手法 (DNAアダクトーム) の現状と将来展望 第81回分析化学討論会、Web開催 (2021年5月)
- 5) 森川朋美、豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子. ラットを用いたヘム鉄の90日間亜慢性反復経口投与毒性試験. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催 (2021年6月)
- 6) 藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐淵英機. アグリコン型イソフラボンによるホルモン活性がDonryuラットにおける乳がんおよび子宮内膜がんの発生を促進する. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催 (2021年6月)
- 7) 梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. Pueraria mirificaのエストロゲン作用によるDonryuラットにおける乳がんの発生. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催 (2021年6月)
- 8) 加藤寛之、内木綾. STAT3-DPYD経路を介したLuteolinの膵癌化学予防効果の検討. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催 (2021年6月)
- 9) 戸塚ゆ加里. DNA付加体の網羅的解析手法 (DNAアダクトーム) の現状と将来展望 第144回日本薬理学会関東支部会、Web開催 (2021年6月)
- 10) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機.

- 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年7月)
- 11) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年7月)
  - 12) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子.  $\gamma$ -H2AX 免疫染色を用いた芳香族アミンのラット膀胱に対する傷害性および発がん性短期評価手法. 第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
  - 13) 赤木純一、曹永晚、豊田武士、水田保子、曾根瑞季、小川久美子. 肝発がん物質検出のためのバイオマーカーとしての EpCAM および CD13 の有用性検討. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸(2021年7月)
  - 14) 赤根弘敏、豊田武士、水田保子、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子. 内分泌攪乱物質による血中ホルモン値変動と病理組織学的・免疫組織化学的評価. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸(2021年7月)
  - 15) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. シスプラチン誘発急性腎障害から慢性腎臓病への進展における CD44 の発現. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
  - 16) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 2021年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム(AdAMS)】」若手支援技術講習会、Web開催 (2021年9月)
  - 17) 孫雨晨、齊藤公亮、牛木淳人、安部光洋、齋藤好信、柏田建、堀益靖、弦間昭彦、巽浩一郎、服部登、津島健司、荒川憲昭、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、佐藤元信、高松一彦、森和彦、西矢剛淑、泉高司、大野泰雄、斎藤嘉朗、花岡正幸. メタボローム解析を用いた薬剤性間質性肺炎のバイオマーカー探索. 第65回日本薬学会関東支部大会、Web開催 (2021年9月)
  - 18) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. 単環芳香族アミン化合物の試験管内反応による二量体形成. がん予防学術大会2021、Web開催 (2021年9月)
  - 19) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. シスプラチン誘発 AKI to CKD モデルラットにおける CD44 の病態生理学的役割. 第164回日本獣医学会学術集会、Web開催 (2021年9月)
  - 20) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年9月)
  - 21) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露芳香族アミン類による膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝物の関係. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 22) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 23) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 24) 豊田武士、赤根弘敏、小川久美子.  $\gamma$ -H2AX 免疫染色によるラット腎発がん物質早期検出法の開発. 第80回日本癌学会学術総会、横浜(2021年10月)
  - 25) 赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ラット膀胱発がん物質早期検出における  $\gamma$ -H2AX 免疫染色の特異性. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 26) 加藤寛之、内木綾、稲熊真悟、小村理行、高橋智. DPYD regulation in pancreatic cancer cell. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 27) 戸塚ゆ加里. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 28) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. 単環芳香族アミンの遺伝毒性に関わる代謝活性化機構. 環境変異原ゲノム学会第50回記念大会、横須賀 (2021年11月)
  - 29) 松下幸平、高須伸二、石井雄二、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. gpt delta ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法による 1,3-dichloro-2-propanol の発がん機序の解明. 環境変異原ゲノム学会第50回記念大会、横須賀 (2021年11月)
  - 30) 戸塚ゆ加里. 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価. 第50回環境変異原学会、横須賀 (2021年11月)
  - 31) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 急性腎障害後に発現する CD44 は部分的上皮間葉転換を生じた尿細管において細胞外基質産生を誘導し、慢性腎臓病への移行を促進する. 第4回医薬品毒性機序研究会、Web開催 (2021年12月)
  - 32) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響及び尿中代謝物との関係. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 33) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 1,4-ジオキサンのin vivo変異原性及び発がん性の定量解析. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 34) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、山口貴嗣、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会・

第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）

- 35) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐淵英機。肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索。第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
- 36) 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐淵英機。炭酸脱水素酵素阻害剤AcetazolamideのWnt/ $\beta$ カテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果。第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
- 37) 梯アンナ、鰐淵英機。NAFLD/NASH 肝発がんの促進機序への最近の洞察。第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
- 38) 豊田武士、小林琢磨、三好規之、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。オルト-トルイジンおよびオルト-アニシジン代謝物の28日間反復経口投与によるラット膀胱への影響。第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸（2022年1月）
- 39) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子。F344ラットを用いたナノサイズ酸化チタン(IV)の28日間反復経口投与毒性試験。第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸（2022年1月）
- 40) 赤根弘敏、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小坂忠

司、田島均、青山博昭、小川久美子。ラットにおける化学物質誘発抗甲状腺作用検出における病理組織学的及び免疫組織化学的手法と血中ホルモン値との比較。第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸（2022年1月）

- 41) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。薬剤性腎障害の慢性化を予測するバイオマーカーとしてのCD44の有用性の検証。第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸（2022年1月）
- 42) 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智。膀胱癌におけるDPYD発現の寄与と発現抑制機序の検討。第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸（2022年1月）
- 43) 戸塚ゆ加里。ゲノムおよびDNA付加体の網羅的解析により環境因子とがん発生との関連を解明する。第95回日本薬理学会、福岡（2022年3月）
- 44) 戸塚ゆ加里。ナノマテリアルに特化した新規 *in vitro* 生体模倣評価系の開発。日本薬学会 第142年会、Web開催（2022年3月）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



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。令和3年度は非遺伝毒性肝発がん物質19種類と、非発がん物質1種類の合計20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。今回検討した化学物質において従来モデルでは、感度42%(8/19物質)、特異度100%(1/1)と判定された。令和2年度に検討した物質の一部を投与方法や投与量を変更して検討したが、一部感度の改善を認めたものの、大幅な改善は見られなかった。感度の改善のため、低用量でも発がん物質を陽性と判定する予測モデルとして、高感受性モデルを開発し検討した結果、感度84%(16/19物質)と改善した。高感受性モデルは、以前の試験データによる解析と合わせて、感度69%、特異度85%、正答率が79%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・安心を保证する。

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3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、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（従来モデル）。

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 $\alpha$ 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（14遺伝子モデル）。

さらに、発がん物質検出感度を改善するため、14遺伝子モデルで用いた14遺伝子について、従来はがん原性試験で50%に腫瘍発生を認める投与量（TD50）以上

を、判定陽性とする予測モデルを構築していたが、低用量においても判定を陽性として新たに予測モデルを再構築した（高感受性モデル）。

本年度は、非遺伝毒性肝発がん物質 19 種：Thioacetamide (TAA)、Phenobarbital, sodium (PB)、Methyl carbamate (MCB)、1,4-Dioxane (1,4-D)、Methyleugenol (MEG)、2-Nitrotoluene (2NT)、Chlorendic acid(CRA)、N,N-Dimethylformamide (DMF)、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)、Clofibrate (CF)、Hexachlorobenzene (HCB)、Wy-14643 (WY)、Chlorobenzene (CB)、Furan、dl-Ethionine (DL-ET)、Doxylamine succinate (DOX)、Methapyrilene hydrochloride (MP)、Nitrobenzene (NB) を、非肝発がん物質 1 種：Hexachlorophene (HCP) を用いた。このうち、TAA、PB、1,4-D、CFB、CRA、DL-ET、DOX、HCP については、前年度に行った化学物質で強制胃内投与による再検討を行った。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

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。その結果、非遺伝毒性肝発がん物質 19 物質のうち 8 物質 (42%) が発がん物質として判定された。一方、非発がん物質 HCP については陰性と判定されている。以上より今年度の正答率は 45% だった (表 1)。

表 1. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果 (従来モデル)

施設	投与物質	略名	発がん性	投与方法・量	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	陽性	45 mg/kg ig	陽性	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	500 mg/kg ig	陰性	×
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	1000 mg/kg ig	陰性	×
	Methyleugenol	MEG	陽性	250 mg/kg ig	陰性	×
	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	300 mg/kg ig	陰性	×
香川大	Chlorendic acid	CRA	陽性	5 g/kg diet	陰性	×
	N,N-Dimethylformamide	DMF	陽性	10 g/kg diet	陰性	×
	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	陽性	50 g/kg diet	陽性	○
	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	PHMB	陽性	2 g/kg drink	陰性	×
	Clofibrate	CF	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
国立衛試	Hexachlorobenzene	HCB	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
	Wy-14643	WY	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Chlorobenzene	CB	陽性	250 mg/kg ig	陰性	×
	Furan	Furan	陽性	30 mg/kg ig	陽性	○
	名市大	dl-Ethionine	DL-ET	陽性	200 mg/kg ig	陰性
Doxylamine succinate		DOX	陽性	200 mg/kg ig	陰性	×
Methapyrilene hydrochloride		MP	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
Nitrobenzene		NB	陽性	125 mg/kg ig	陰性	×
Hexachlorophene		HCP	陰性	20 mg/kg ig	陽性	○

一方、14 遺伝子モデルを用いた解析における非遺伝毒性肝発がん物質の検出を行った結果を表 2 に示す。遺伝毒性肝発がん物質 19 物質のうち 12 物質 (63%) が発がん物質として判定された。非発がん物質 HCP については陰性と判定されている。以上より今年度の正答率は 65% だった。

表 2. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果 (14 遺伝子モデル)

施設	投与物質	略名	発がん性	投与方法・量	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	陽性	45 mg/kg ig	陽性	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	500 mg/kg ig	陰性	×
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	1000 mg/kg ig	陰性	×
	Methyleugenol	MEG	陽性	250 mg/kg ig	陽性	○
	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
香川大	Chlorendic acid	CRA	陽性	5 g/kg diet	陽性	○
	N,N-Dimethylformamide	DMF	陽性	5 g/kg diet	陰性	×
	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	陽性	50 g/kg diet	陽性	○
	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	PHMB	陽性	2 g/kg drink	陰性	×
	Clofibrate	CF	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
国立衛試	Hexachlorobenzene	HCB	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
	Wy-14643	WY	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Chlorobenzene	CB	陽性	250 mg/kg ig	陰性	×
	Furan	Furan	陽性	30 mg/kg ig	陽性	○
	名市大	dl-Ethionine	DL-ET	陽性	200 mg/kg ig	陽性
Doxylamine succinate		DOX	陽性	200 mg/kg ig	陰性	×
Methapyrilene hydrochloride		MP	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
Nitrobenzene		NB	陽性	125 mg/kg ig	陰性	×
Hexachlorophene		HCP	陰性	20 mg/kg ig	陽性	○

昨年度の非遺伝毒性発がん物質の一部について、投与方法を強制胃内投与に変更した結果、従来モデルおよび14遺伝子モデルいずれも1物質陽性判定が増え、感度は上昇したものの大きく改善はされなかった (表 3, 4)。

表 3. 投与方法および投与濃度変更による発がん性判定結果 (従来モデル)

投与物質	略名	発がん性	令和2年		令和3年			
			投与方法・量	判定	成否	投与方法・量	判定	成否
Thioacetamide	TAA	陽性	0.5g/kg diet	陽性	○	45 mg/kg ig	陽性	○
Phenobarbital, sodium	PB	陽性	0.5g/L drink	陰性	×	100 mg/kg ig	陽性	○
Chlorendic acid	CRA	陽性	1.25g/kg diet	陰性	×	5 g/kg diet	陰性	×
Clofibrate	CF	陽性	5g/kg diet	陽性	○	300 mg/kg ig	陽性	○
dl-Ethionine	DL-ET	陽性	1g/kg diet	陰性	×	200 mg/kg ig	陰性	×
Doxylamine succinate	DOX	陽性	2g/kg diet	陰性	×	200 mg/kg ig	陰性	×
Hexachlorophene	HCP	陰性	0.15g/kg diet	陰性	○	20 mg/kg ig	陰性	○
1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	5g/L drink	陰性	×	1000 mg/kg ig	陰性	×

表 4. 投与方法および投与濃度変更による発がん性判定結果 (14 遺伝子モデル)

投与物質	略名	発がん性	令和2年		令和3年			
			投与方法・量	判定	成否	投与方法・量	判定	成否
Thioacetamide	TAA	陽性	0.5g/kg diet	陽性	○	45 mg/kg ig	陽性	○
Phenobarbital, sodium	PB	陽性	0.5g/L drink	陽性	○	100 mg/kg ig	陽性	○
Chlorendic acid	CRA	陽性	1.25g/kg diet	陽性	○	5 g/kg diet	陽性	○
Clofibrate	CF	陽性	5g/kg diet	陽性	○	300 mg/kg ig	陽性	○
dl-Ethionine	DL-ET	陽性	1g/kg diet	陰性	×	200 mg/kg ig	陰性	×
Doxylamine succinate	DOX	陽性	2g/kg diet	陰性	×	200 mg/kg ig	陽性	○
Hexachlorophene	HCP	陰性	0.15g/kg diet	陰性	○	20 mg/kg ig	陰性	○
1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	5g/L drink	陰性	×	1000 mg/kg ig	陰性	×

表 5. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果 (高感受性モデル)

施設	投与物質	略名	発がん性	投与方法・量	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	陽性	45 mg/kg ig	陽性	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	500 mg/kg ig	陽性	○
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	1000 mg/kg ig	陽性	○
	Methyleugenol	MEG	陽性	250 mg/kg ig	陽性	○
	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
香川大	Chlorendic acid	CRA	陽性	5 g/kg diet	陽性	○
	N,N-Dimethylformamide	DMF	陽性	5 g/kg diet	陰性	×
	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	陽性	50 g/kg diet	陽性	○
	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	PHMB	陽性	2 g/kg drink	陰性	×
	Clofibrate	CF	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
国立衛試	Hexachlorobenzene	HCB	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
	Wy-14643	WY	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Chlorobenzene	CB	陽性	250 mg/kg ig	陽性	○
	Furan	Furan	陽性	30 mg/kg ig	陽性	○
	名市大	dl-Ethionine	DL-ET	陽性	200 mg/kg ig	陽性
Doxylamine succinate		DOX	陽性	200 mg/kg ig	陽性	○
Methapyrilene hydrochloride		MP	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
Nitrobenzene		NB	陽性	125 mg/kg ig	陰性	×
Hexachlorophene		HCP	陰性	20 mg/kg ig	陽性	×

そこで、より感度を改善するため、高感受性モデルを

開発し検討した結果、非遺伝毒性肝発がん物質19物質のうち16物質(84%)が発がん物質として判定された。一方、非発がん物質HCPについては陽性と判定されている。以上より今年度の正答率は80%だった(表5)。

これまで検証した全ての79化学物質について、各モデルにおける感度、特異度および正答率と表6にまとめた。従来モデルに比べ、14遺伝子モデルは感度が高く特異度も遜色なく正答率も80%以上認める優秀なモデルではあるが、感度が60%以下と問題点が存在する。今年度作成した高感受性モデルは、感度が約70%と現行モデルから大幅な改善を認める優秀なモデルである一方で、特異度が下がっており改善が望まれる。

表6. これまでに検討した79物質の予測モデルごとの成績

予測モデル	従来モデル	14遺伝子モデル	高感受性モデル
感度	41% (13/32)	56% (18/32)	69% (22/32)
特異度	100% (47/47)	98% (46/47)	85% (40/47)
正答率	76% (60/79)	81% (64/79)	79% (62/79)

#### D. 考察

今回、検討した化学物質において、従来モデルでは感度が低い結果となり、14遺伝子モデルで改善されているものの6割程度と、より高い感度のモデル構築が望まれる結果となった。そこで、より感度の高い予測モデルとして高感受性モデルを開発し、今年度の化学物質において8割以上を、全体としても7割程度の感度を認める改善されたモデルが作成できた。一方で、特異度が85%と従来のモデルに比べ低下しており、改善する必要がある。また、投与方法や投与量の変更は感度改善に一定の評価を得たものの、大きくは改善されなかった。今後も、より高い感度とともに、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、感度69%、特異度85%、正答率79%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, Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. *J Toxicol Pathol*. 2022. In press.
- 2) Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment. *PLoS One*. 2022; 17: e0263895.

- 3) Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2021; 259: 3127-36.
- 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) 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.
- 6) Kawata K, Baba A, Shiota M, Wanibuchi H, Baba Y. ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *J Biochem*. 2021; 170: 483-8.
- 7) Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2021; 13: 3613.
- 8) 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、魏民、鰐淵英機. Luteolinによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第110回日本病理学会総会、東京(2021年4月)
- 2) 藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐淵英機. アグリコン型イソフラボンによるホルモン活性がDonryuラットにおける乳がんおよび子宮内膜がんの発生を促進する. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催(2021年6月)
- 3) 梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. Pueraria mirificaのエストロゲン作用によるDonryuラットにおける乳がんの発生. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催(2021年6月)
- 4) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸(2021年7月)
- 5) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第48回日本毒性

- 学会学術年会、神戸（2021年7月）
- 6) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 2021年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム(AdAMS)】」若手支援技術講習会、Web開催（2021年9月）
  - 7) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露香族アミン類による膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝物の関係. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
  - 8) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
  - 9) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
  - 10) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年9月）
  - 11) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響及び尿中代謝物との関係. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
  - 12) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 1, 4-ジオキサンの *in vivo*変異原性及び発がん性の定量解析. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
  - 13) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、山口貴嗣、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
  - 14) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐淵英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
  - 15) 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐淵英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤AcetazolamideのWnt/ $\beta$ カテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
  - 16) 梯アンナ、鰐淵英機. NAFLD/NASH 肝発がんの促進機序への最近の洞察. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

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。令和3年度は、非遺伝毒性肝発がん物質6種を、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、従来の予測モデルにおいては、2物質が発がん物質と判定される一方で、新規予測モデルでは4物質が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」（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3年度は、昨年度に陰性と判定された一部の物質について、投与方法および投与濃度を変更して検討するとともに、新たに新規の非遺伝毒性肝発がん物質を用いて、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論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。加えて、より高い精度を求め開発した14遺伝子からなる新規予測モデルを用いて、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6種：Thioacetamide (TAA; 45 mg/kg)、Phenobarbital, sodium (PB; 100 mg/kg)、Methyl carbamate (MCB; 500 mg/kg)、1,4-Dioxane (1,4-D; 1000 mg/kg)、Methyleugenol (MEG; 250 mg/kg)、2-Nitrotoluene (2NT; 300 mg/kg)を強制胃内投与した。

（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、MCBおよび2NT投与群において、対照群に比べ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、TAA、PB、1,4-Dおよび2NT投与群においては肝臓相対重量が対照群に比べ有意な増加を認めた（表1）。



表1. 体重および肝重量、摂餌・飲水量

Treatment	No. of rat	Body weight (g)	Liver		Food consumption	Water consumption
			Absolute (g)	Relative (%)		
Control	5	426.0 ± 50.5	16.6 ± 3.4	3.9 ± 0.4	20.9 ± 2.9	32.2 ± 3.5
TAA	5	318.5 ± 23.6 **	14.4 ± 1.3	4.5 ± 0.2*	16.3 ± 6.4	26.6 ± 10.2
PB	5	391.5 ± 36.1	20.4 ± 2.7	5.2 ± 0.3***	20.4 ± 7.8	28.3 ± 11.0
MCB	4	359.3 ± 34.6 *	13.7 ± 2.0	3.8 ± 0.2	18.5 ± 2.0	26.1 ± 3.7
Control	6	407.4 ± 21.1	17.1 ± 1.5	4.2 ± 0.2	20.6 ± 1.2	29.6 ± 2.1
1,4-D	5	368.7 ± 13.9	16.8 ± 1.5	4.6 ± 0.3*	17.5 ± 7.2	29.1 ± 13.3
2NT	5	346.4 ± 37.9 **	18.3 ± 2.4	5.2 ± 0.2***	17.5 ± 6.9	29.5 ± 11.6
MEG	4	386.7 ± 22.5	17.2 ± 0.9	4.5 ± 0.1	20.6 ± 1.9	32.8 ± 4.6

\*, \*\*, \*\*\*: P < 0.05, 0.01 and 0.001 vs Control, respectively  
TAA: thioacetamide; PB: phenobarbital, sodium; MCB: methyl carbamate; 1,4-D: 1,4-Dioxane; 2NT: 2-Nitrotoluene; MEG: Methyleneugenol

肝臓の組織学的検討した結果、TAA、PB、1,4-Dおよび2NT投与群においてZone 3での肝細胞腫大と好酸性化が存在した。MEGにおいても、Zone 3での軽度の肝細胞腫大と好酸性化が存在した。また、TAAでは核小体も目立った。MCB投与群では、投与群との差がはっきりしなかった(図1)。

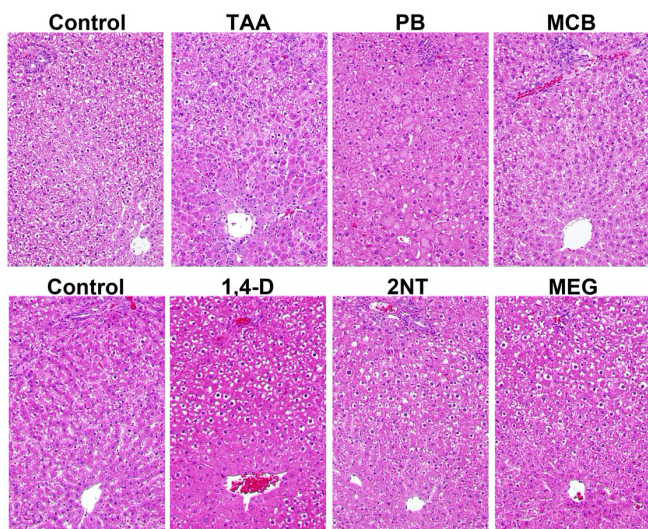


図1. 各物質を投与したラット肝組織像

各肝組織からRNAを抽出した結果、平均47.8 ± 18.3 μgのtotal RNAを回収し、質もA260/A280が平均2.13 ± 0.02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2.0倍以上、発現差が1.5倍以上変動した遺伝子は、TAA投与群においては上昇535、低下687、PB投与群では上昇457、低下447、MCB投与群では上昇539、低下530、1,4-D投与群では上昇528、低下460、2NT投与群では上昇442、低下579、MEG投与群では上昇358、低下605の遺伝子を認めた。

表2. 各物質における発がん性判定結果

投与物質	略名	発がん性	従来モデル		新規モデル	
			判定	成否	判定	成否
Thioacetamide	TAA	陽性	陽性	○	陽性	○
Phenobarbital, sodium	PB	陽性	陽性	○	陽性	○
Methyl carbamate	MCB	陰性	陰性	×	陰性	×
1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	陰性	×	陰性	×
Methyleneugenol	MEG	陽性	陰性	×	陽性	○
2-Nitrotoluene	2NT	陽性	陰性	×	陽性	○

各投与群における遺伝子発現データについて、構築済み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、従来の予測モデルにおいては、TAAおよびPBのみ陽性と判定され、他の4物質は陰性と判定された。一方、新規

予測モデルにおいては、TAA、PBに加え、2NTおよびMEGにおいても陽性と判定された(表2)。

## D. 考察

今回、どちらの予測モデルにおいても発がん物質として同定できたTAAおよびPBは、強い肝組織像の変化も存在し、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。昨年度、摂餌投与で陰性となったPBが強制胃内投与により陽性となったことから、投与濃度および投与方法について検討する必要がある。2NTやMEGは従来の予測モデルでは陰性と判定されたものの、新規予測モデルにおいて陽性と判定されており、新規予測モデルの感度の高さを示した。一方で、1,4-Dは肝相対重量の増加や肝組織変化を認めるものの、いずれの予測モデルでも陰性と判定され、発がん機序が、この予測モデルで判定できる機序と異なる可能性が疑われた。MCBは体重増加抑制を認める濃度での投与を行ったが、肝重量や肝組織において大きな変化を認めず、いずれの予測モデルでも陰性と判定された。肝組織変化がない場合には検出が困難である可能性を示した。

## E. 結論

化審法で実施される28日間反復投与試験において摘出した肝臓から得られた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) Suzuki S, Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. *J Toxicol Pathol.* 2022. In press.
- 2) 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.
- 3) Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H. Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability. *Cell Rep.* 2021; 37: 109988.
- 4) 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.
- 5) 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; 42: 940-50.
- 6) Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2021; 13: 3613.
  - 7) 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.
  - 8) Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, Suzuki S, Yabata H, Koizumi R, Moriyoshi H, Yazawa I. Selective extension of cerebral vascular calcification in an autopsy case of Fahr's syndrome associated with asymptomatic hypoparathyroidism. *Neuropathology*. 2021; 41: 387-95.
2. 学会発表
- 1) 鈴木周五、魏民、鰐淵英機. Luteolinによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第110回日本病理学会総会、東京 (2021年4月)
  - 2) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年7月)
  - 3) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年7月)
  - 4) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 2021年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS)】」若手支援技術講習会、Web開催 (2021年9月)
  - 5) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年9月)
  - 6) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露芳香族アミン類による膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝物の関係. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 7) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 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. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 8) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 9) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響及び尿中代謝物との関係. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 10) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性及び発がん性の定量解析. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 11) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、山口貴嗣、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 12) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐淵英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 13) 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐淵英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤AcetazolamideのWnt/ $\beta$ カテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

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3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3年度は、6週齢の雄SDラットに300 mg/kg Clofibrate (CFB)、300 mg/kg Hexachlorobenzene (HCB)、100 mg/kg Pirinixic acid (Wy-14643)、250 mg/kg Chlorobenzene (CB) および30 mg/kg Furan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、投与物質はそれぞれ肝細胞肥大あるいは胆管線維症等、特徴的な肝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3年度の被験物質として非遺伝毒性肝発がん物質5種：Clofibrate (CFB)、Hexachlorobenzene (HCB)、Pirinixic acid (Wy-14643)、Chlorobenzene (CB)およびFuranを、6週齢の雄SDラットに、溶媒（コーン油）対照群とともに28日間強制経口投与した（各群5匹）。被験物質の中で、HCBは化審法に定める第一種特定化学物質、CBは優先評価化学物質にそれぞれ指定されている。各物質の投与濃度は短期試験における最大耐量として、300 mg/kg CFB、300 mg/kg HCB、100 mg/kg Wy-14643、250 mg/kg CBおよび30 mg/kg Furan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委託して実施した。

（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・摂餌量・飲水量を表1に示す。投与開始後3週目以降、HCB投与群の2匹が投与前後に振戦を呈し、25日目に斃死した。Wy-14643・CB・Furan投与群において、有意な体重増加抑制が認められた。摂餌量はFuran投与群でやや低値の傾向を示し、飲水量に群間で差はみられなかった。

各投与群における肝および腎重量を表2に示す。CFB・HCB・Wy-14643・Furan投与群では肝絶対/相対重量の増



加、CB 投与群では肝相対重量の増加、HCB 投与群では腎絶対/相対重量の増加、CFB・Wy-14643・CB・Furan 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・摂餌量・飲水量

Treatment	Body weight (g)		Food consumption (g/rat/day)	Water intake (g/rat/day)
	Initial	Week 4		
Control	186.4 ± 8.9	432.4 ± 40.4	23.0	36.9
CFB	186.2 ± 6.8	395.0 ± 23.0	21.9	41.3
HCB	186.2 ± 7.5	394.4 ± 33.4	19.8	36.4
Wy-14643	186.8 ± 12.0	348.1 ± 36.7**	20.1	30.9
CB	186.4 ± 7.7	371.3 ± 29.9*	21.9	38.0
Furan	186.0 ± 8.0	355.0 ± 44.1*	18.4	41.3

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

CFB, clofibrate; HCB, hexachlorobenzene; Wy-14643, pirinixic acid; CB, chlorobenzene.

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	18.4 ± 2.25	4.25 ± 0.14	2.99 ± 0.32	0.69 ± 0.02
CFB	23.1 ± 0.58**	5.87 ± 0.33**	3.38 ± 0.22	0.85 ± 0.03**
HCB	31.1 ± 1.28**	7.92 ± 0.59**	3.84 ± 0.25**	0.98 ± 0.02**
Wy-14643	28.0 ± 5.35**	8.00 ± 0.91**	3.20 ± 0.30	0.92 ± 0.06**
CB	18.1 ± 1.71	4.88 ± 0.32**	2.97 ± 0.26	0.80 ± 0.03**
Furan	24.8 ± 2.49**	7.00 ± 0.48**	2.79 ± 0.31	0.79 ± 0.05**

\*\*;  $P < 0.01$  vs. Control by *t*-test.

CFB, clofibrate; HCB, hexachlorobenzene; Wy-14643, pirinixic acid; CB, chlorobenzene.

肝臓の病理組織学的検索の結果、CFB・Wy-14643 投与群では細胞質の好酸性顆粒状変化を伴う肝細胞肥大が、CFB 投与群では小葉中心性、Wy-14643 投与群ではび漫性に認められた (図 1)。HCB・CB 投与群においても小葉中心性肝細胞肥大が認められ、細胞質はそれぞれ好酸性、あるいは淡明なすりガラス状を呈した。Wy-14643 投与群にはこれに加えて、小葉辺縁部における胆管過形成も観察された。Furan 投与群では、肝細胞の変性および壊死、核の大型化がび漫性にみられたほか、胆管線維症および oval cell の過形成が、特に尾状葉において顕著に認められた。

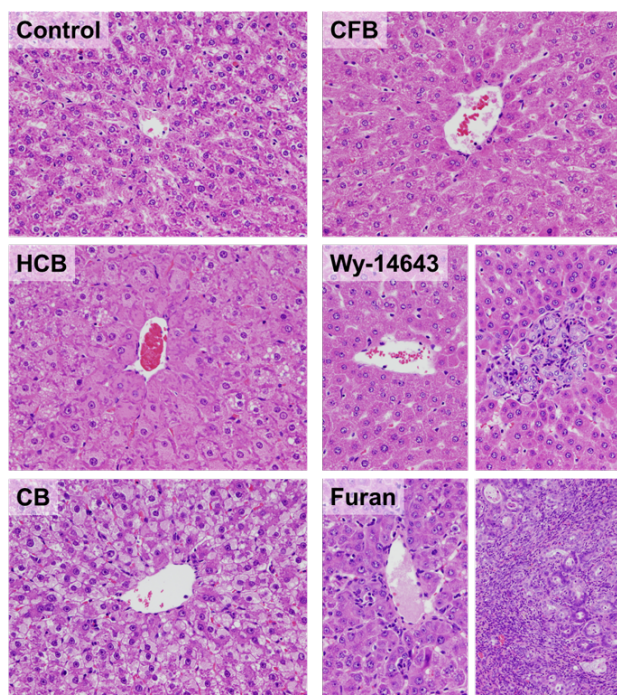


図 1. 各投与群の肝臓における病理組織学的変化

## D. 考察

令和 3 年度は、非遺伝毒性肝発がん物質 5 種について、短期試験での最大耐量を用いたラット 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、好酸性顆粒状またはすりガラス状肝細胞肥大および胆管線維症等、投与物質ごとに異なる特徴的な肝病変を誘発することが明らかとなった。

CFB および Wy-14643 は高脂血症治療薬として利用され、PPAR $\alpha$  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。HCB はかつて農薬 (殺菌剤) や工業的用途に用いられたが、現在は第一種特定化学物質に指定され、流通は限定的である。ラットに対し滑面小胞体の増加を誘導することが報告されており、今回認められた好酸性すりガラス状の肝細胞肥大が該当する所見と考えられた。CB は合成中間体や有機溶媒として汎用され、優先評価化学物質に指定されている。ほとんどの遺伝毒性試験に陰性を示し、非遺伝毒性肝発がん物質とされているが、がん原性試験における雄 F344 ラットでの肝腫瘍発生率は 16% (8/49) と、対照群 (8%, 8/100) と比較してわずかな増加にとどまる (NTP, 1985)。Furan は合成中間体の一種であるが、コーヒーや加工食品など、様々な食品中に存在することが知られている。ラット肝臓に対して本研究で認められたような種々の病変を引き起こし、長期的には肝細胞・胆道系腫瘍を発生させる。発がん機序として、代謝物 (シス-2-ブテン-1, 4-ジアルデヒド) を介した遺伝毒性の関与も疑われている (JECFA, 2011)。

今後、肝臓の網羅的遺伝子発現解析を実施し、遺伝子セットを用いた肝発がん性短期検出法の検証を行う予定である。

## E. 結論

令和 3 年度は、非遺伝毒性肝発がん物質 5 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、いずれの投与物質も肝細胞肥大あるいは胆管線維症等、それぞれ特徴的な肝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) Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-(1-menthoxy)ethanol in F344 rats. *Journal of toxicologic pathology*. 2021; 34: 309-17.
- 2) Akane H, Toyoda T, Mizuta Y, Cho YM, Ide T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats. *Journal of applied toxicology*. (in press)

- 3) Matsushita K, Takasu T, Ishii Y, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. *In vivo* mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of *gpt* delta rats. Archives of toxicology. 2021; 95: 3117-31.
- 4) Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu K, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Homma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m ciclesonide aerosol by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. International journal of pharmaceuticals. 2021; 595: 120241.
2. 学会発表
- 1) 山本栄一、高橋祐次、栗形麻樹子、齊藤洋克、松下幸平、豊田武士、佐藤太、北嶋聡、小川久美子、伊豆津健一、斎藤嘉朗、平林容子、飯村康夫、本間正充、奥田晴宏、合田幸広。脱離エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析イメージングによるシクレソニドの 1  $\mu$ m エアロゾル吸入後のラット肺におけるシクレソニドとその代謝物の空間的局在の可視化。日本薬剤学会第 36 年会、Web 開催 (2021 年 5 月)
- 2) 森川朋美、豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子。ラットを用いたヘム鉄の 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験。日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会、Web 開催 (2021 年 6 月)
- 3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。 $\gamma$ -H2AX 免疫染色を用いた芳香族アミンのラット膀胱に対する傷害性および発がん性短期評価手法。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 4) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、曾根瑞季、小川久美子。肝発がん物質検出のためのバイオマーカーとしての EpCAM および CD13 の有用性検討。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 5) 赤根弘敏、豊田武士、水田保子、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子。内分泌攪乱物質による血中ホルモン値変動と病理組織学的・免疫組織化学的評価。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 6) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シスプラチン誘発急性腎障害から慢性腎臓病への進展における CD44 の発現。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 7) 孫雨晨、齊藤公亮、牛木淳人、安部光洋、齋藤好信、柏田建、堀益靖、弦間昭彦、巽浩一郎、服部登、津島健司、荒川憲昭、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、佐藤元信、高松一彦、森和彦、西矢剛淑、泉高司、大野泰雄、斎藤嘉朗、花岡正幸。メタボローム解析を用いた薬剤性間質性肺炎のバイオマーカー探索。第 65 回日本薬学会関東支部大会、Web 開催 (2021 年 9 月)
- 8) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆかり、若林敬二、三好規之。単環芳香族アミン化合物の試験管内反応による二量体形成。がん予防学術大会 2021、Web 開催 (2021 年 9 月)
- 9) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シスプラチン誘発 AKI to CKD モデルラットにおける CD44 の病態生理学的役割。第 164 回日本獣医学会学術集会、Web 開催 (2021 年 9 月)
- 10) 豊田武士、赤根弘敏、小川久美子。 $\gamma$ -H2AX 免疫染色によるラット腎発がん物質早期検出法の開発。第 80 回日本癌学会学術総会、横浜 (2021 年 10 月)
- 11) 赤根弘敏、豊田武士、小川久美子。ラット膀胱発がん物質早期検出における  $\gamma$ -H2AX 免疫染色の特異性。第 80 回日本癌学会学術総会、横浜 (2021 年 10 月)
- 12) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆかり、若林敬二、三好規之。単環芳香族アミンの遺伝毒性に関わる代謝活性化機構。環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、横須賀 (2021 年 11 月)
- 13) 松下幸平、高須伸二、石井雄二、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子。*gpt* delta ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法による 1,3-dichloro-2-propanol の発がん機序の解明。環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、横須賀 (2021 年 11 月)
- 14) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。急性腎障害後に発現する CD44 は部分的上皮間葉転換を生じた尿細管において細胞外基質産生を誘導し、慢性腎臓病への移行を促進する。第 4 回医薬品毒性機序研究会、Web 開催 (2021 年 12 月)
- 15) 豊田武士、小林琢磨、三好規之、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。オルト-トルイジンおよびオルト-アニジン代謝物の 28 日間反復経口投与によるラット膀胱への影響。第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022 年 1 月)
- 16) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子。F344 ラットを用いたナノサイズ酸化チタン (IV) の 28 日間反復経口投与毒性試験。第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022 年 1 月)
- 17) 赤根弘敏、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子。ラットにおける化学物質誘発抗甲状腺作用検出における病理組織学的及び免疫組織化学的手法と血中ホルモン値との比較。第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022 年 1 月)
- 18) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。薬剤性腎障害の慢性化を予測するバイオマーカーとしての CD44 の有用性の検証。第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022 年 1 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 香川大学医学部医学教育学 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、Chlorendic acid (5g/kg diet)、N,N-Dimethylformamide (5g/kg diet)、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (50g/kg diet)、Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride (2g/kg in water) を投与し、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、従来法である106遺伝子での解析の場合、Bis\_2\_ethylhexyl\_Phthalateのみ陽性であった。新たに作成した14遺伝子によるセットでの解析の場合、Chlorendic acidとBis(2-ethylhexyl) Phthalateのいずれも陽性と判定された。今後、他施設の結果と合わせて結論を出したい。

## 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。多施設による協同体制にて多数の化学物質を同時に評価することにより、評価法の標準化を推進し、国際動向を見据えたOECDテストガイドライン化を実現する。

当施設ではこれまで開発した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性をより一層検証し、確立することを目的とした。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3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遺伝子セットおよび新たに作成した14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。

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、Chlorendic acid (5g/kg diet)、N,N-Dimethylformamide (5g/kg diet)、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (50g/kg diet)、Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride (2g/kg in water) を投与し検討を行った。

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

日本チャールズリバー社（神奈川県厚木）より購入した4週齢のSDラット（雄性）について、2週間の馴化期間の後に実験を開始した。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

きさで2スライス切り出した。それぞれ1mLのRNAlaterが入った1.5mLチューブへ移した(合計2本、そのうち1本は、他施設でのバリデーション用)。1.5mLチューブを4°Cで一晩保管後、-80°Cへ長期保管した。凍結保存サンプル用として、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5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ーンによる数理的アルゴリズムによるモデル)に入力し、肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った。

(倫理面の配慮)

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

### C. 研究結果

hydrochloride (2g/kg in water) 群において、実験開始1週目に著明な体重減少が見られたため(図1)、これ以降、用量を2g/kgから1g/kgへ減量して投与することとした。実験終了時まで動物の死亡例はなく、予定通り、29日目に実験終了した。全群において、動物の状態に著変は認められなかった。

剖検時の体重および肝重量を表1に示す。Bis(2-ethylhexyl) Phthalate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、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate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。

肉眼所見では群間の相違は見られなかった。病理組織所見(図4)では、Control群と比べて、Chlorendic acid群では門脈域を中心とした肝細胞の核周囲空胞化、N,N-Dimethylformamide群では門脈域を中心とした広範で顕著な肝細胞の核周囲空胞化、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate群では中心静脈域を中心とした肝細胞腫大(50g/kg diet)、Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride群では門脈域を中心とした肝細胞空胞化

が認められた。

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物質は、106遺伝子での解析の場合、Bis(2-ethylhexyl) Phthalateのみ陽性であった。新たに作成した14遺伝子によるセットでの解析の場合、Chlorendic acidとBis(2-ethylhexyl) Phthalateのいずれも陽性と判定された。

### D. 考察

今回用いた被験物質の発癌性については、Chlorendic acid, IARC Group 2B; N,N-Dimethylformamide, IARC group 4; Bis(2-ethylhexyl) Phthalate, IARC Group 2B; Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride, suspected of causing cancer (EU)とさている。106遺伝子の解析よりも14遺伝子の解析は、感度が高いと推測されるが、他施設の結果と合わせて評価が必要である。

### E. 結論

今回、遺伝子セットを用いた判定方法により、106遺伝子での解析の場合、Bis(2-ethylhexyl) Phthalateのみ陽性であった。新たに作成した14遺伝子によるセットでの解析の場合、Chlorendic acidとBis(2-ethylhexyl) Phthalateのいずれも陽性と判定された。今後、他施設の結果と合わせて結論を出したい。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Nakano-Narusawa Y, Yokohira M, Yamakawa K, et al. Relationship between Lung Carcinogenesis and Chronic Inflammation in Rodents. *Cancers* (Basel). 2021; 13.
- 2) Yokohira M, Oshima M, Yamakawa K, et al. Adequate tissue sampling for the assessment of pathological tumor regression in pancreatic cancer. *Sci Rep*. 2021; 11: 6586.

#### 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	Chemicals	Dose	No.	Body weights (g)	Liver weights	
					Absolute (g)	Relative (%)
1	Chlorendic acid	5g/kg diet	5	333.4 ± 20.9	9.2 ± 1.5	2.7 ± 0.4
2	N,N-Dimethylformamide	5 g/kg diet	5	334.4 ± 25.2	14.7 ± 2.7	4.4 ± 1.0
3	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	50 g/kg diet	5	224.6 ± 48.9*	17.6 ± 3.8*	7.9 ± 1.1*
4	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	2→1 g/kg in water	5	328.4 ± 16.7	13.3 ± 1.4	4.1 ± 0.3
5	Control		5	375.5 ± 32.1	12.2 ± 2.3	3.3 ± 0.5

\*P<0.05 vs control group

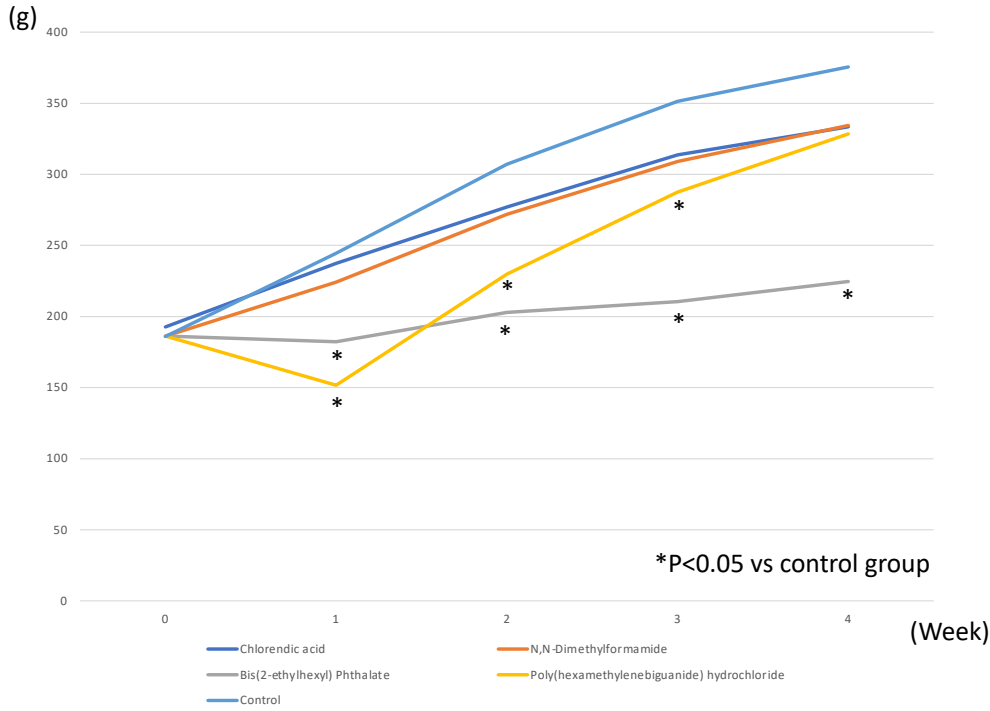


図 1. 体重の経時的変化

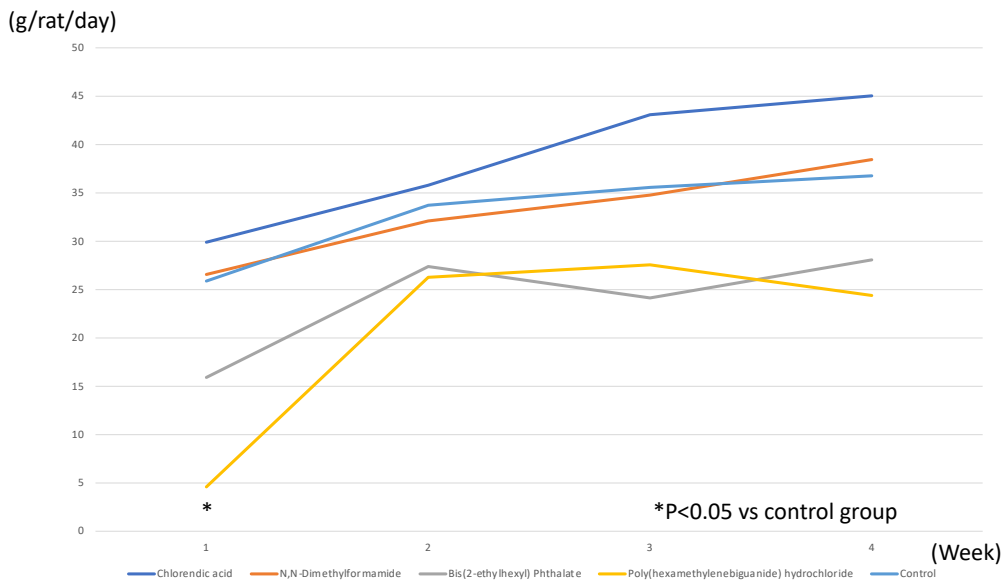


図 2. 飲水量の経時的変化



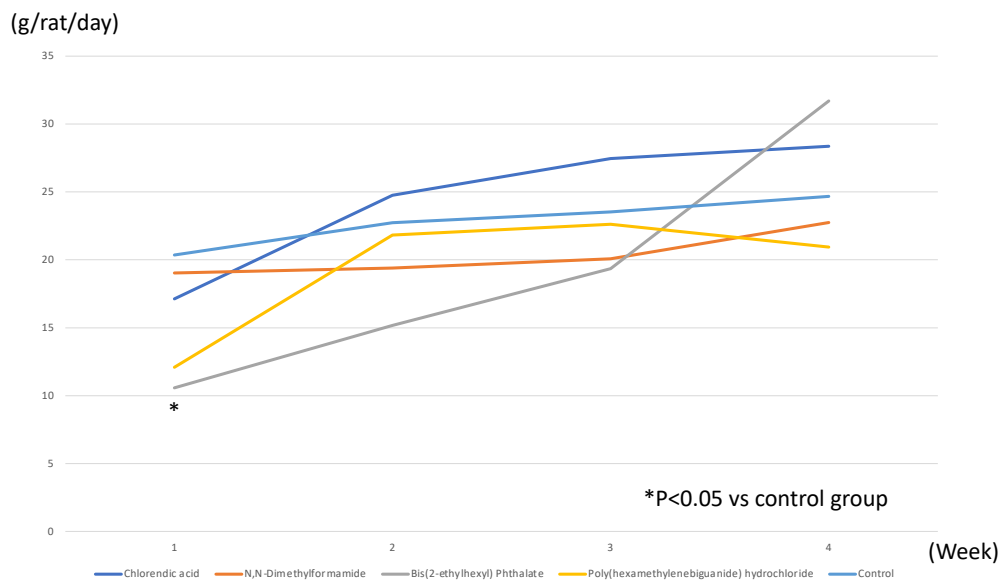


図 3. 摂餌量の経時的変化

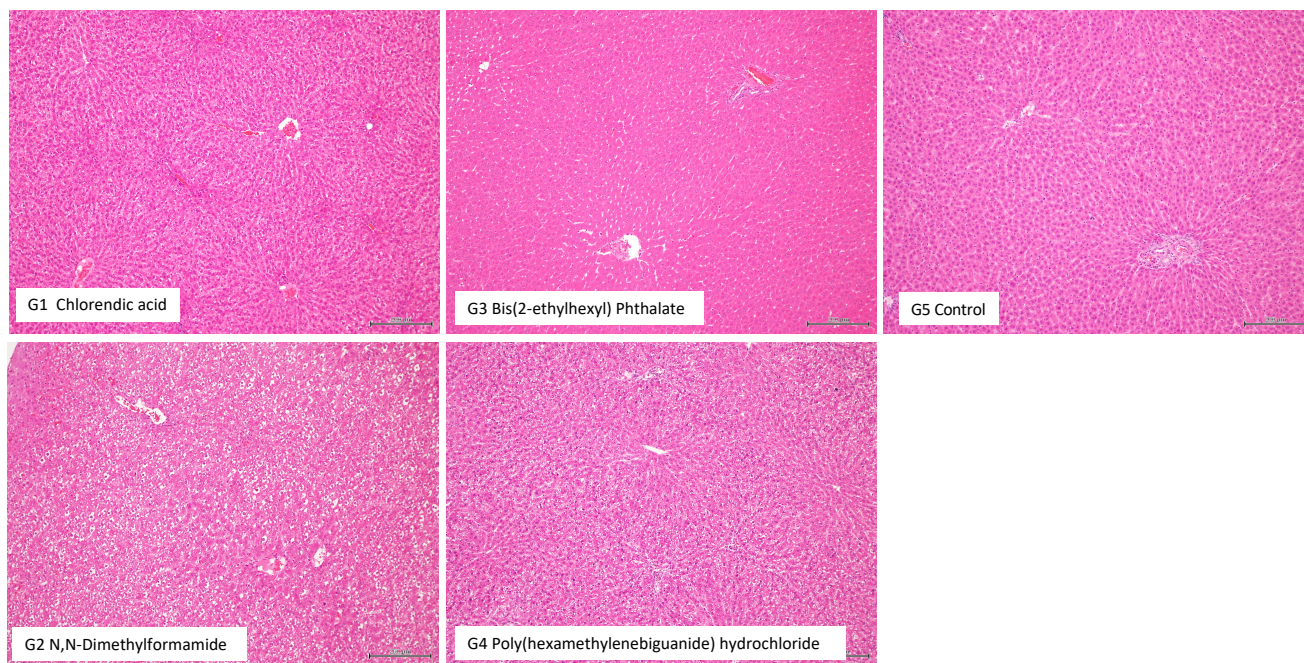


図 4. 各群のラット肝臓の病理組織像

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 講師

## 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、「優先評価化学物質」についての発がん性評価を実施した。本年度は非遺伝毒性肝発がん物質として昨年度の摂餌投与で陰性を示した dl-Ethionine、Doxylamine succinate、新規物質として Methapyrilene hydrochloride、優先化学評価物質として Nitrobenzene、非発がん物質として昨年度摂餌投与を行った Hexachlorophene の5被験物質を用いて、28日間胃内投与を行った。投与後の肝臓を用いたマイクロアレイデータを用いて従来の106遺伝子セットによる肝発がん性予測を行うとともに、新規に構築した14遺伝子セットによる肝発がん性予測を行った。その結果、dl-Ethionine、Methapyrilene hydrochloride、Nitrobenzene 投与により体重抑制が見られ、Methapyrilene hydrochloride 投与では肝臓での高度な組織学的変化と Ki-67 陽性率の増加を伴っていた。肝発がん性予測において、従来の106遺伝子セットによる評価では、Methapyrilene hydrochloride が陽性、それ以外の4物質は陰性を示し、一致率は40%(2/5)であった。一方で、新規の14遺伝子セットによる評価では、Methapyrilene hydrochloride と Doxylamine succinate が陽性を示し、一致率は60%(3/5)となり改善がみられた。

### 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の確立を目指す。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)では、遺伝毒性肝発がん物質を対象として抽出した10遺伝子の発現をRT-PCRにより定量することで、60被験物質(肝発がん物質23物質)における発がん性の検出は感度82.6%、特異度97.3%であった。本研究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種類の非遺伝毒性肝発がん物質をそれぞれ投与した肝臓マイクロアレイの結果から構築した発がん物質検出のための106遺伝子による評価系を用いて、その有用性について検討する。

令和2年度においては、検討した16物質と予測モデルで検討した物質[感度73%(11/15物質)、特異度100%(42/42)]を加えた結果、感度54%(14/26)、特異度100%(47/47)で、正答率が84%(61/73)となった。問題点として、感度が低い点が挙げられた。本年度は改善策として遺伝子セットの構築の変更や、遺伝子セット構築で行った試験と同様に、胃内投与による検討を行う事などが挙げられた。

そこで令和3年度においては、本大学で令和2年度に偽陰性を示した非遺伝毒性肝発がん物質である dl-Ethionine (DL-ET)、Doxylamine succinate (DOX)および非発がん物質である Hexachlorophene (HCP)のラット28日間投与を、摂餌ではなく胃内投与で再度試験を行うとともに、新規の非遺伝毒性肝発がん物質である Methapyrilene hydrochloride (MPH)と優先評価化学物質である Nitrobenzene (NB)のラット28日間胃内投与試験を行った。その後肝臓からRNAを抽出し、遺伝子セットを用いた発がん性検出能について評価した。

(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21-005)。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。

### 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雄ラットに各群5匹(DL-ET, NBのみ6匹)でDL-ET(200 mg/kg/day)、DOX(200 mg/kg/day)、MPH(100 mg/kg/day)、NB(125 mg/kg/day)、HCP(20 mg/kg/day)を28日間胃内投与した。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実施した。Ki-67は外側左葉における陽性率をAperio CS2 (Leica)で測定した。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、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実施した。また、新しく再構築した14遺伝子セットによる発がん性検出能を評価した。

### C. 研究結果

MPH群(100mg/kg/day)は、day 17, 28で1匹ずつ投与直後に全身痙攣を起こして死亡した。屠殺時(n=3)は体重、絶対肝重量の有意な抑制と相対腎重量の有意な増加がみられた(表1)。組織学的には、Kupffer細胞の増生、門脈域における偽胆管増生、リンパ球浸潤、褐色色素の沈着など比較的強い変化がみられた(図1)。また、肝細胞におけるKi-67陽性率の有意な上昇(図2)と、門脈域周囲の肝細胞主体にGST-P発現が観察された(図3)。

表1: 屠殺時体重と臓器重量

n	体重 (g)	肝		腎(左右)		脾(固定後)	
		重量 (g)	相対 (%)	重量 (g)	相対 (%)	重量 (g)	相対 (%)
Cont	422±27	14.8±2.4	3.50±0.40	2.74±0.19	0.65±0.04	0.71±0.11	0.17±0.02
MPH	302±6***	10.4±0.6**	3.44±0.16	2.33±0.17	0.77±0.07*	0.46±0.09	0.15±0.03
DL-ET	347±37***	10.7±1.0***	3.09±0.19	2.33±0.23	0.67±0.05	0.55±0.08	0.16±0.02
DOX	407±14	17.3±1.4	4.23±0.25**	2.76±0.19	0.68±0.06	0.67±0.06	0.16±0.01
NB	359±24**	16.0±1.5	4.47±0.42***	2.66±0.14	0.74±0.06	2.18±0.51***	0.60±0.11***
HCP	374±37	15.3±1.5	4.10±0.14*	2.74±0.39	0.73±0.07	0.59±0.15	0.16±0.03

\*\*\*,\*\*\*\*: P < 0.05, 0.01, 0.001 v.s. Cont

DL-ET群(200 mg/kg/day)は、実験期間中の死亡はみられなかった。屠殺時(n=6)は体重、絶対肝重量の有意な抑制がみられた(表1)。組織学的には、Kupffer細胞の増加はみられたが、令和2年度の摂餌投与例と比較して肝細胞における核分裂像、Ki67陽性率の増加傾向はみられなかった(図1, 2)。

DOX群(200mg/kg/day)では、実験期間中の死亡や体重抑制はみられなかったが、屠殺時(n=5)は相対肝重量の有意な増加を認めた(表1)。組織学的には、令和2年度の摂餌投与例と同様に中心静脈周囲の肝細胞肥大が軽度みられるとともに、同部位における小脂肪滴沈着(3/5匹)が観察された(図2)。

NB群(125 mg/kg/day)はday 9においてNB群で2匹にメトヘモグロビン血症と考えられる麻痺が出現し、day 10で1匹死亡したため、1日の休薬後投与量を半量(62.5 mg/kg/day)に変更した。屠殺時(n=5)には有意な体重減少と相対肝重量の上昇と著明な脾腫を認めた(表1)。組織学的には、軽度の中心静脈周囲の肝細胞肥大と小リンパ球集簇像を散見した(図1)。また、中心静脈周囲のGST-P陽性細胞を確認した(図3)。

HCP群(20 mg/kg/day)は、実験期間中の死亡や体重抑制はみられず、屠殺時(n=5)は相対肝重量の増加が観察された(表1)。組織学的には少量であるがリンパ球小集簇像を散見した(図2)。

マイクロアレイデータを用いた106遺伝子による解析では、発がん性物質であるMPH、DL-ET、DOXのうちMPHは陽性判定を示し、DL-ET、DOXは令和2年度の摂餌投与例と同様に陰性であった。陰性物質であるHCPは令和2年度の摂餌による検討と同様に陰性を示した。また、優先化学物質で肝発がん物質であるNBは陰性を示し、一致率は40%(2/5物質)であった。一方、新規の14遺伝子セットによる検討では、DOXが陰性から陽性判定に変化し、それ

以外の物質は106遺伝子セットによる予測と同様の結果であったため、一致率は60%(3/5物質)となり、改善が見られた(表2)。

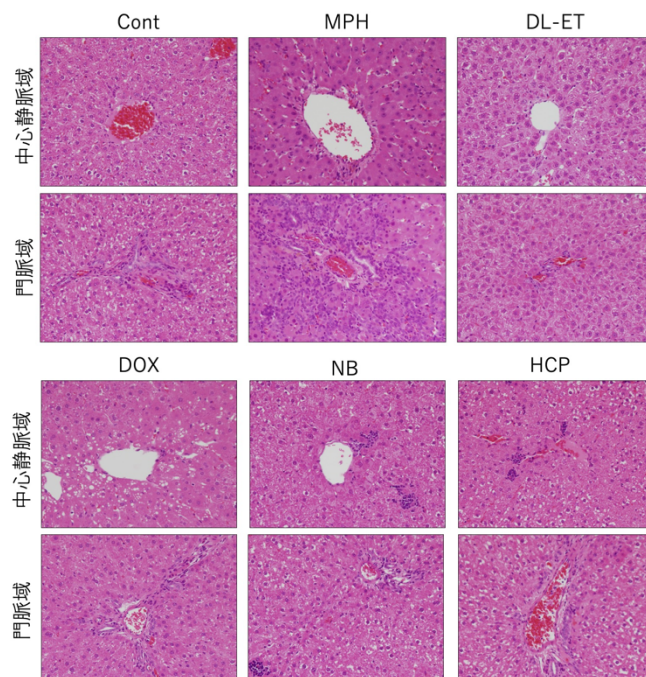


図1. 肝臓のH&E (x200)

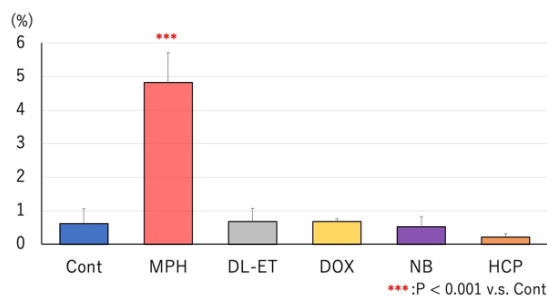


図2. Ki-67 labeling index (外側左葉)

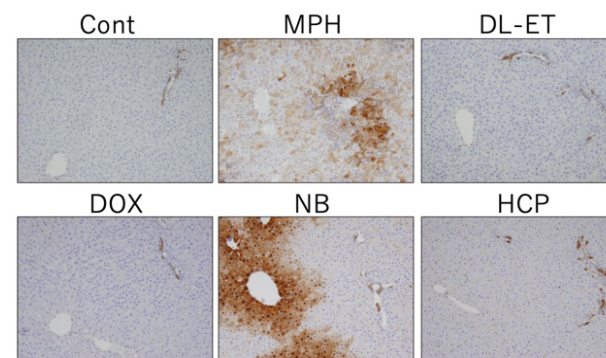


図3. GST-P 陽性細胞 (x100)

### D. 考察

令和2年度に行ったDL-ET, DOX, HCPに関しては、28日間での平均摂取量がそれぞれ、78 mg/kg/day, 145 mg/kg/day, 11 mg/kg/dayに対し、本実験では200 mg/kg/day, 200 mg/kg/day, 20 mg/kg/dayと前回より多い量の投与を行い死亡個体なく実験を完遂した。そのため、DL-ET群では体重抑制が強くみられた。DOX群、

HCP群では、昨年度は肝臓の変化はほとんどみられなかったが、本実験においては相対肝重量の増加や、肝組織ではDOX群では小脂肪滴の沈着がみられ、より強い変化が観察された。

表2：肝発がん性予測の結果

肝発がん性		106遺伝子 による判定	成否	14遺伝子 による判定	成否
MPH	非遺伝性肝発がん物質	陽性	○	陽性	○
DL-ET	非遺伝性肝発がん物質	陰性	×	陰性	×
DOX	非遺伝性肝発がん物質	陰性	×	陽性	○
NB	優先評価化学物質	陰性	×	陰性	×
HCP	非発がん物質	陰性	○	陰性	○

非遺伝毒性肝発がん物質であるMPHは体重増加抑制とともに肝臓の組織学的に著明な変化やKi-67陽性率の増加がみられ、発がん性を示す十分量の投与ができたと考える。

優先評価化学物質であるNBではメトヘモグロビン血症と考えられる麻痺の出現や著明な脾腫など肝以外の全身性変化が強く、投与量の減量を余儀なくされた。肝臓の変化はそれ程強くみられないものの、中心静脈周囲にGST-P発現が誘導される興味深い所見が得られた。NBの代謝物であるNitrosobenzeneはグルタチオン抱合により代謝されるため、グルタチオン活性の高い中心静脈周囲でGST-Pの発現が高くなったと推測されるが、詳細な機序についてはさらなる検討が必要である。

本年度は評価遺伝子の再検討を行い、発がん性検出能の向上がみられた(総括研究報告書参照)。我々の検討においても、106遺伝子セットによる発がん性予測の検討では、DL-ET、DOX、HCPは令和2年度の摂餌による投与における結果と同様に陰性を示した。一方、新規に構築した14遺伝子セットによる評価では、DL-ET、HCPは混餌投与、胃内投与のいずれも発がん性の有無と一致した結果となり、DOXでは混餌投与では発がん性の有無と不一致、胃内投与では一致した結果となった。このことから、投与経路の変更による改善も示唆された。

一方で、今年度に初めて検討した肝発がん性物質のMPHは組織学的にも著明な変化を示し、従来の106遺伝子セットと新規の14遺伝子セットの両者において、発がん性予測は陽性を示した。また、優先評価化学物質であるNBは肝発がん物質であるものの両遺伝子セットによる解析で陰性を示した。その原因として、メトヘモグロビン血症の出現により62.5 mg/kg/dayの半量にしたことが考えられる。CIITで行われたSDラットを用いた2年間吸入暴露試験では、25 ppm暴露で有意な肝発がん促進(0 ppm:2/63, 25 ppm:9/65, P=0.036)を認めているが、25 ppmはラットの呼吸量(73 ml/min)と体重(400 g換算)から32.85 mg/g/day相当であることから、今回のNB投与量は発がんの観点から十分量であると考えられる。しかし、2年間の発がん性実験からNBの肝発がん性は比較的弱い事が示唆されるため、そのような物質に対しては高用量を含めた複数の濃度における検討が必要である。

## E. 結論

令和2年度に行ったDL-ET、DOX、HCPの試験を摂餌から

胃内投与に変更して再検討した結果、従来の106遺伝子セットでは令和2年度と同様の判定を示したが、新規の14遺伝子セットでは、胃内投与におけるDOXの陽性を確認する事が可能になった。また新規に検討した肝発がん性物質のMCPはいずれの遺伝子セットでも陽性を示し、その有用性を確認できた。優先化学物質のNBはいずれの遺伝子セットでも陰性を示し、弱い肝発がん性が示唆される物質の検出については、再度濃度設定を含めた検討が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ozeki T, Shimura T, Ozeki T, Ebi M, Iwasaki H, [Kato H](#), et al. The risk analyses of lymph node metastasis and recurrence for submucosal invasive colorectal cancer: Novel criteria to skip completion surgery. *Cancers*. 2022; 14:822.
- 2) Asano G, Miyabe K, [Kato H](#), et al. Relevance of gene mutations and methylation to the growth of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms based on pyrosequencing. *Sci Rep*. 2022; 12: 419.
- 3) Aoyama Y, Naiki-Ito A, Xiaochen K, Komura M, [Kato H](#), et al. Lactoferrin prevents hepatic injury and fibrosis via the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Nutrients*. 2021; 14:42.
- 4) Wanifuchi-Endo Y, Kondo N, Dong Y, Fujita, T, Asano T, Hisada T, Uemoto Y, Nishikawa S, Katagiri Y, Kato A, Terada M, Sugiura H, Okuda K, [Kato H](#), et al. Discovering novel mechanisms of taxane resistance in human breast cancer by whole-exome sequencing. *Oncol Lett*. 2022; 23: 60.
- 5) Kachi K, [Kato H](#), Naiki-Ito A, et al. Anti-allergic drug suppressed pancreatic carcinogenesis via down-regulation of cellular proliferation. *Int J Mol Sci*. 2021; 22:7444.
- 6) Subhawa S, Naiki-Ito A, [Kato H](#), et al. Suppressive effect and molecular mechanism of *Houttuynia cordata* Thunb. extract against prostate carcinogenesis and castration-resistant prostate cancer. *Cancers*. 2021; 13:3403.
- 7) 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](#), et al. Low RAI2 expression is a marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2021; 187: 81-93.
- 8) [Kato H](#), Naiki-Ito A, Suzuki S, et al. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer.

Carcinogenesis. 2021; 42: 940-950.

- 9) Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, Kato H, et al. PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients. Virchows Arch. 2021; 479:277-284.
- 10) 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 et al. 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: 434-443.

## 2. 学会発表

- 1) 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智. エラグ酸の膵発癌抑制効果の検討. 第110回日本病理学会

総会、東京 (2021年4月)

- 2) 加藤寛之、内木綾. STAT3-DPYD 経路を介した Luteolin の膵癌化学予防効果の検討. 第27回日本食品化学学術大会、東京 (2021年6月)
- 3) 加藤寛之、内木綾、稲熊真悟、小村理行、高橋智. DPYD regulation in pancreatic cancer cell. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
- 4) 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智. 膵癌における DPYD 発現の寄与と発現抑制機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022年1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、これまでの検討において、陰性と判定された遺伝毒性陽性であるが発がん性不明の「監視化学物質」1種類及び偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質の3種類について投与用量を上げて検討した。その結果、4種類すべて陰性と判定された。これまでに実施した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%及び特異度95%と、高い精度で検出可能である。今後、更なる精度向上のため、偽陰性になった遺伝毒性肝発がん物質についても検出できる補完モデルの開発を行い、本モデルと組み合わせることで、より精度の高い総合的な予測モデルの開発を行う。

### 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」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3年度は、これまでの検討において、陰性と判定された遺伝毒性陽性であるが発がん性不明の「監視化学物質」1種類及び偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質の3種類について投与用量を上げて検討した。

### B. 研究方法

6週齢の雄SDラットに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用量は表1に示す。

判定対象物質として、令和2年度に、陰性と判定された4物質（監視対象化学物質であるDisperse Blue 134 (DB-134)、優先評価化学物質であるo-phenylenediamine (OPD)、既知の遺伝毒性肝発がん物質であるSafrole及び1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ))を用いた。DB-134及びADBAQの投与用量を令和2年度の1000 mg/kgからOECD TG420 急性経口毒性試験において定められている最高用量の2000 mg/kgに上げた。OPDの投与用量を令和2年度の170 mg/kg (1/3 of LD50)から340 mg/kg (2/3 of LD50)及び510 mg/kg (LD50)に、Safroleの投与用量を令和2年度の650 mg/kg (1/3 of LD50)から1300 mg/kg (2/3 of LD50)と1950 mg/kg (LD50)にそれぞれ上げた。なお、溶媒対照群(対照群)として0.5% Methyl cellulose (MC) 投与群を設けた。

表1 令和3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)	投与用量 (mg/kg)
DB-134 監視化学物質	遺伝毒性+ 「発がん性不明」	不明	2000*
OPD 優先評価化学物質	遺伝毒性+ 肝発がん物質	510	340 <sup>#</sup> 510 <sup>##</sup>
Safrole	遺伝毒性+ 肝発がん物質	1950	1300 <sup>#</sup> 1950 <sup>##</sup>
ADBAQ	遺伝毒性+ 肝発がん物質	不明	2000*
0.5% MC	溶媒 (陰性対照物質)		

\*OECD TG420急性経口毒性試験において定められている最高用量

<sup>#</sup>LD50の1/3に相当する用量

<sup>##</sup>LD50に相当する用量



被験物質投与後 24 時間後に剖検を行い、肝臓を摘出した。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 の大きさを 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、液体窒素で凍結後、-80℃で凍結保管した(1 本は DNA adduct 解析用)。病理組織学検討サンプルとして、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%中性緩衝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 抽出及び cDNA の合成はそれぞれ RNeasy mini kit (キアゲン) 及び 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

qPCR で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った。本モデルでは、遺伝毒性ラット肝発がん物質を「陽性」、その他の物質(非遺伝毒性ラット肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質)を「陰性」と判定する。その結果、本年度に検討した 4 物質はすべて「陰性」と判定された。

### D. 考察

遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法については、遺伝毒性陽性で発がん性不明の「監視化学物質」DB-134は OECD TG420 急性経口毒性試験において定められている最高用量の 2000 mg/kg においても「陰性」と判定されたことから、遺伝毒性非肝発がん物質である可能性が示唆された。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ことが示された。一方、遺伝毒性肝発がん物質である OPD、Safrole 及び ADBAQ が 2000 mg/kg あるいは LD50 用量においても、「陰性」と判定されたことから、本モデルの検出力に限界がある可能性が示された。今後は本モデルの限界についての検証を引き続き行うと同時に、偽陰性になった遺伝毒性肝発がん物質についても検出できる補完モデルの開発を行い、本モデルと組み合わせることで、より精度の高い総合的な予測モデルの開発を行う。

### E. 結論

我々が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。今後は本モデルの限界について検証を引き続き行うと同時に、検出感度をさらに高めるため、補完モデルの開発を行い、本モデルと組み合わせることで、より精度の高い総合的な予測モデルの開発を行う。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Suzuki S, Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. *J Toxicol Pathol.* 2022. In press.
- 2) Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H. Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability. *Cell Rep.* 2021; 37: 109988.
- 3) 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.
- 4) Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 3613.
- 5) 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、魏民、鰐淵英機. Luteolinによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第110回日本病理学会総会、東京(2021年4月)
- 2) 藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐淵英機. アグリコン型イソフラボンによるホルモン活性がDonryuラットにおける乳がんおよび子宮内膜がんの発生を促進する. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催(2021年6月)
- 3) 梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. Pueraria mirificaのエストロゲン作用によるDonryuラットにおける乳がんの発生. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催(2021年6月)
- 4) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸(2021年7月)

- 5) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第48回日本毒理学学会学術年会、神戸 (2021年7月)
- 6) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 2021年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム(AdAMS)】」若手支援技術講習会、Web開催 (2021年9月)
- 7) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年9月)
- 8) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露香族アミン類による膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝物の関係. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
- 9) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
- 10) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
- 11) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性及び発がん性の定量解析. 第38回日本毒理学病理学会総会・第1回アジア毒理学病理学連盟学術集会、神戸 (2022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

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 日本大学薬学部 環境衛生学 教授

## 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。昨年度は、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解析し、得られた統合データを用いて 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。今年度は、2018 年および2019 年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し、HRAM-アダクトームの再分析を実施したが、正答率の向上にはつながらなかった。そこで、毒性予測モデルの正答率向上に向け、これまでモデル作成に用いてきたランダムフォレスト(RF)ではなく、線形判別分析(LDA)を用い、かつ毒性予測モデルの実用性の観点から遺伝毒性・発がん性ともに陰性の物質を予測できればよいのではないかと考え、毒性ラベルを再構成した予測モデルの検討を実施した。その結果、学習アルゴリズムについては RF、LDA の正答率は殆ど同じか若干 LDA の方が良く、毒性ラベルが「++」と「--」のみの物質を使用した場合には、2018 年度測定データで約 100%、2019 年度測定データで 54-73%、2021 年度測定データで 65-89%となり、いずれもラベル変更前のデータより 10-30%増加した。一方、毒性ラベルを「--」と「それ以外」に置き換えた場合は、2018 年度測定データでおおよそ 100%に達し、2019 年度測定データで 66-76%、2021 年度測定データで 74-95%となり、いずれもラベル変更前のデータより 10-50%増加した。

## 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。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以下に示す。

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"> <li>遺伝毒性肝発がん物質 (+/+): 9種 o-Aminoazotoluene (AA), Dimethylnitrosamine (DMN), 3-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (MDA), 4,4'-Thiodianiline (TDA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosodimethanamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylaniline (NEMA), Nitrosodibutylamine (NB), N-Nitrosopyrrolidine (NNP)</li> <li>遺伝毒性非肝発がん物質 (+/-): 3種 Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT)</li> <li>非遺伝毒性肝発がん物質 (-/+): 2種 Monocrotaline (MCT), Phenobarbital (PB)</li> <li>非遺伝毒性非肝発がん物質 (-/-): 16種 Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TbB), Aspirin (ASA), Triamterene (TR), Indomethacin (IN), Phenylbutazone (PhB), Promethazine (PMZ), Sulindac (SUL), Tetracycline (TC), Ethionamide (ETH) Theophylline (TED), Caffeine (CAF), Chloramphenicol (CMP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>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 (C1-1510)(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), Retrorsin (RTS), Tris (1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP), Vinyl Bromide (VB)</li> <li>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)</li> <li>非遺伝毒性肝発がん物質 (-/+): 5種 Carbon Tetrachloride (CCL4), Coumarine (Coumarine), Ethynylestradiol (EE), Gemfibrozil (GFZ), Hexachlorobenzene (HCB)</li> <li>非遺伝毒性非肝発がん物質 (-/-): 8種 Allyl alcohol (AA), Butylated hydroxyanisole (BHA), Chlorpheniramine (CHL), Chlorpropamide (CPP), Furosemide (FUR), Methyldopa (MDP), Methimazole (MTZ), Sulfasalazine (SS)</li> </ul>
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。また、今年度は予測精度向上のために、2018年および2019年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し(表1参照)、HRAM-アダクトームの再分析を実施した。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には遺伝毒性/肝発がん性の情報がない化学物質に対して実施することを想定して、Leave-One-Out交差検証により予測結果の精度評価を行った。Leave-One-Out交差検証は、ある曝露物質のデータをテスト用とし、他の曝露物質のデータを用いて学習したモデルの精度を評価することを、物質を変えながら繰り返す検証方法であり、毒性が未知の物質に対する予測を模擬した精度評価方法である。この方法を用いて、今年度はこれまでの遺伝毒性、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ではなく、毒性ラベルが「++」と「--」または「++」と「それ以外」に分けて予測精度の向上について検討した。学習アルゴリズムとしては、ランダムフォレスト(RF)と線形判別分析(LDA)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、日本大学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

2018年および2019年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し、今年度HRAM-アダクトームの再

分析を実施した結果を図2に示す(2021データ)。LDA解析を行なったところ、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、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。

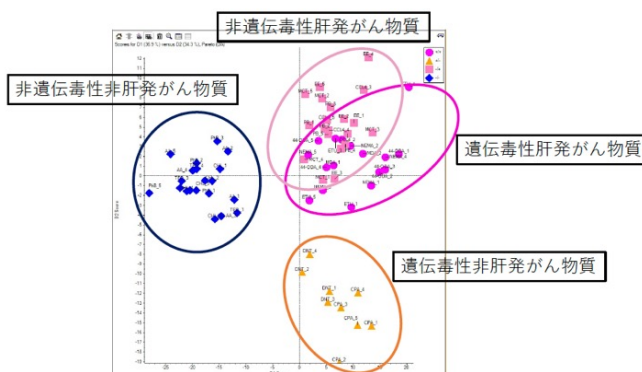


図2. 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(LDA解析による)

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2021年データセットに対して予測を行ったところ、予測結果が低いことがわかった(表1)。

表1. 遺伝毒性の予測結果

物質名	ラベル	測定年度	正答数	回答数	正答率	予測++	予測--	予測+	予測-
AA	--	2019	4	5	0.8	0	0	1	4
CHL	--	2019	4	5	0.8	0	0	1	4
PhB	--	2018	5	5	1	0	0	0	5
TEO	--	2018	5	5	1	0	0	0	5
CCL4	++	2019	3	5	0.6	2	0	3	0
EE	++	2019	5	5	1	0	0	5	0
MCT	++	2018	1	5	0.2	2	0	1	2
PB	++	2018	0	5	0	1	0	0	4
CPA	+-	2018	0	5	0	0	0	4	1
DNT	+-	2019	0	4	0	2	0	1	1
44-ODA	++	2019	2	5	0.4	2	0	3	0
ETU	++	2019	0	5	0	0	0	4	1
MDA	++	2018	1	2	0.5	1	0	1	0
NEM A	++	2018	1	5	0.2	1	0	4	0
合計			31	66	0.47				

そこで、毒性予測モデルの正答率向上に向け、これまでモデル作成に用いてきたランダムフォレスト(RF)ではなく、線形判別分析(LDA)を用い、かつ毒性予測モデルの実用性の観点から遺伝毒性・発がん性ともに陰性の物質を予測できればよいのではないかと考え、毒性ラベルを再構成した予測モデルの検討を実施した。その結果、学習アルゴリズムについてはRF、LDAの正答率は殆ど同じか若干LDAの方が良く、毒性ラベルが「++」と「--」のみの物質を使用した場合には、2018年度測定データで約100%、2019年度測定データで54-73%、2021年度測定データで65-89%となり、いずれもラベル変更前のデータより10-30%増加した(表2)。

一方、毒性ラベルを「--」と「それ以外」に置き換えた場合では、2018年度測定データでおおよそ100%に達し、2019年度測定データで66-76%、2021年度測定デ



ータで 74-95%となり、いずれもラベル変更前のデータより 10-50%増加した (表 3)。

表2. 毒性ラベルを「++」と「--」に限定した場合の平均的な正答率

学習アルゴリズム	2018 年度データ		2019 年度データ		2021 年度データ	
	物質毎	サンプル毎	物質毎	サンプル毎	物質毎	サンプル毎
RF	0.98	0.99	0.54	0.72	0.65	0.76
LDA	0.97	0.98	0.58	0.73	0.73	0.89

表3. 毒性ラベルを「--」と「それ以外」に限定した場合の平均的な正答率

学習アルゴリズム	2018 年度データ		2019 年度データ		2021 年度データ	
	物質毎	サンプル毎	物質毎	サンプル毎	物質毎	サンプル毎
RF	1.00	1.00	0.66	0.76	0.74	0.76
LDA	0.97	0.97	0.70	0.73	0.91	0.95

## D. 考察

今年度は、2018年および2019年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し、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(2021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、47%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。そこで、毒性予測モデルの正答率向上に向け、これまでモデル作成に用いてきたランダムフォレスト(RF)ではなく、線形判別分析(LDA)を用い、かつ毒性予測モデルの実用性の観点から遺伝毒性・発がん性ともに陰性の物質を予測できればよいのではないかと考え、毒性ラベルを再構成した予測モデルの検討を実施した。その結果、学習アルゴリズムについてはRF、LDAの正答率は殆ど同じか若干LDAの方が良く、毒性ラベルが「++」と「--」のみの物質を使用した場合および毒性ラベルを「--」と「それ以外」に置き換えた場合にラベル変更前のデータより正答率が大きく改善されることがわかった。今後は、更なる正答率向上について検討を行うとともに、正答率に大きく影響する要因について検討する。また、各グループの予測に重要な付加体の探索などについても検討する。

## E. 結論

2018年および2019年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し、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(2021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、47%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。そこで、毒性予測モデルの正答率向上に向け、これまでモデル作成に用いてきたランダムフォレスト(RF)ではなく、線形判別分析(LDA)を用い、かつ毒性予測モデルの実用性の観点から遺伝毒性・発がん性ともに陰性の物質を予測できればよいのではないかと考え、毒性ラベルを再構成した予測モデルの検討を実施した。その結果、学習アルゴリズムについてはRF、LDAの正答率は殆ど同じか若干LDAの方が良く、毒性ラベルが「++」と「--」のみの物質を使用した場合および毒性ラベルを「--」と「それ以外」に置き換えた場合にラベル変更前のデータより正答率が大きく改善されることがわかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing Escherichia coli, Isolated from a Patient with Colorectal Cancer. *In Vivo*. 2022; 36(2): 628-634.
- 2) Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y. Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids, *Front Genet*. 2021; 12: 768781.
- 3) Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, Totsuka Y, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. *In Vivo*. 2021; 35(4):2107-2114.
- 4) Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N4-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 2021; 34(3):912-919.
- 5) Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci*. 2021; 112, 7-15.

### 2. 学会発表

- 1) 戸塚ゆ加里. 質量分析機器を用いたDNA付加体の網羅的解析手法(DNAアダクトーム)の現状と将来展望. 第81回分析化学討論会、Web開催(2021年5月)
- 2) 戸塚ゆ加里. DNA付加体の網羅的解析手法(DNAアダクトーム)の現状と将来展望. 第144回日本薬理学

- 会関東支部会、Web開催（2021年6月）
- 3) 戸塚ゆ加里. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development. 第80回日本癌学会学術総会、第80回癌学会、横浜（2021年10月）
  - 4) 戸塚ゆ加里. 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価. 第50回 環境変異原学会、横須賀（2021年11月）
  - 5) 戸塚ゆ加里. ゲノムおよびDNA付加体の網羅的解析により環境因子とがん発生との関連を解明する. 第95回 日本薬理学会、福岡（2022年3月）
  - 6) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルに特化した新規 in vitro 生体模倣評価系の開発. 日本薬学会 第142年会、Web開催（2022年3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

## 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, Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H.	Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung.	J Toxicol Pat	(In press: Doi:10.1293/tox.2021-0077)		2022
Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S.	FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment.	PLoS One.	17: e0263895.		2022
Wanifuchi-Endo Y, Kondo N, Dong Y, Fujita T, Asano T, Hisada T, Uemoto Y, Nishikawa S, Katagiri Y, Kato A, Terada M, Sugiyama H, Okuda K, Kato H, Takahashi S, Toyama T.	Discovering novel mechanisms of taxane resistance in human breast cancer by whole-exome sequencing.	Oncol Lett.	23:60		2022
Saleh DM, Luo S, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Gunasekaran S, El-Gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohashi M, Tomono S, Hady R, Fukumachi K, Kanno J, Hirose A, Xu J, Suzuki S, Naiki-Ito A, Takahashi S, Tsuda H.	Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study.	Part Fibre Toxicol.	19:30		2022

Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoyama T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M.	Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing Escherichia coli, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer.	In Vivo.	36	628-34	2022
Asano G, Miyabe K, Kato H, Yoshida M, Sawada T, Okamoto Y, Sahashi H, Atsuta N, Kachi K, Kato A, Jinnou N, Natsume M, Hori Y, Naitoh I, Hayashi K, Matsuo Y, Takahashi S, Suzuki H, Kataoka H.	Relevance of gene mutations and methylation to the growth of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms based on pyrosequencing.	Sci Rep.	12:419		2022
Akane H, Toyoda T, Mizuta Y, Choyam, Ide T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K.	Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats.	J Appl Toxicol.	(In press: doi: 10.1002/jat.4327.)		2022
Yokohira M, Oshima M, Yamakawa K, Ye J, Nakano-Narusawa Y, Haba R, Futsumura Y, Hirabayashi K, Yamaguchi H, Kojima M, Okano K, Suzuki Y, Matsuda Y.	Adequate tissue sampling for the assessment of pathological tumor regression in pancreatic cancer.	Sci Rep.	11: 6586		2022
Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y.	Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging.	Int J Pharm.	595: 120241		2021

Tsuda H, Yoshida M, Akiyama F, Ohno Y, Kinowaki K, Kitumaki N, Kondo Y, Saito A, Sasaki E, Nishimura R, Fujii S, Homma K, Horii R, Murata Y, Itami M, Kajitani S, <u>Kato H</u> , Kurosumi M, Sakatani T, Shimizu S, Taniguchi K, Tamiya S, Nakamura H, Kanbayashi C, Shientani 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
<u>Toyoda T</u> , Matsushita K, Akane H, Morioka T, Ogawa K.	A 13-week subchronic toxicity study of 2-(1-menthoxy)ethanol in F344 rats.	J Toxicol Patol.	34	309-17	2021
<u>Totsuka Y</u> , Watanabe M, Lin Y.	New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer.	Cancer Sci.	112	7-15	2021
Takahashi M, Hamaya T, Narita T, Fujii G, <u>Totsuka Y</u> , Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M.	Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice.	In Vivo.	35	2107-14	2021
Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama Y, Yoshikawa A, <u>Wanibuchi H</u> , Azumi A, Honda S.	Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	259	3127-36	2021
<u>Suzuki S</u> , Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, <u>Gi M</u> , <u>Kato H</u> , Naiki T, Naiki-Ito A, <u>Wanibuchi H</u> , 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

Subhawa S, Naiki-Ito A, <u>Kato H</u> , Naiki T, Komura M, Nagano-Matsuo A, Yeewa R, Inaguma S, Chewonarin T, Banjerdpongchai R, Takahashi S.	Suppressive Effect and Molecular Mechanism of Houttuynia cordata Thunb. Extract against Prostate Carcinogenesis and Castration-Resistant Prostate Cancer.	Cancers (Basel)	13			2021
Shimizu K, <u>Gi M</u> , <u>Suzuki S</u> , North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wetli W, Inuzuka H.	Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability.	Cell Rep.	37: 109988			2021
Nishikawa S, Uemoto Y, Kim TS, Hisada T, Kondo N, Watanafuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Dong Y, Sugiura H.	Low RAI2 expression is a marker of poor prognosis in breast cancer. Breast Cancer Res Treat.	Cancer Res Treat	187	81-93		2021
Nakano-Narusawa Y, <u>Yokohira M</u> , Yamakawa K, Ye J, Tanimoto M, Wu L, Mukai Y, Imaida K, Matsuda Y.	Relationship between Lung Carcinogenesis and Chronic Inflammation in Rodents.	Cancers (Basel)	13			2021
Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, <u>Kato H</u> , Naiki-Ito A, Watanabe K, Nagayasu Y, Hosokawa Y, Takiguchi S, Kasai K, Inaguma S, Takahashi S.	PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients.	Virchows Arch	479	277-84		2021
Mori T, Tanaka H, <u>Suzuki S</u> , Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muraguruma K, <u>Wanibuchi H</u> , Ohira M.	Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer.	Cancer Sci	112	1746-57		2021



Matsuyama N, Naiki T, Naiki-Ito A, Chaya R, Kawai 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 te	IJU Case Rep	4	59-63	2021
Matsushita K, Takasu S, Ishii Y, <u>Toyoda T</u> , Yamada T, Morikawa T, Ogawa K.	In vivo mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of gpt delta rats.	Arch Toxicol.	95	3117-31	2021
Komiya M, Ishigami R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, <u>Totsuka Y</u> .	Establishment of Novel Genotoxicity Assay System Using Murine Normal Epithelial Tissue-Derived Organoids.	Front Genet.	12: 768781		2021
Kobayashi T, <u>Toyoda T</u> , Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, <u>Totsuka Y</u> , Wakabayashi K, Miyoshi N.	o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N(4)-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis.	Chem Res Toxicol.	34	912-9	2021
Kawata K, Baba A, Shiota M, <u>Wanibuchi H</u> , Baba Y.	ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca <sup>2+</sup> entry.	J Biochem.	170	483-8	2021
<u>Kato H</u> , Naiki-Ito A, <u>Suzuki S</u> , 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	42	940-50	2021

Kakehashi A, <u>Suzuki S</u> , Shiota M, Raimo N, <u>Gi M</u> , Tachibana T, Stefanov V, <u>Wanibuchi H</u> .	Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis.	Cancers (Basel)	13: 3613		2021
Kakehashi A, Charitayakornkul A, <u>Suzuki S</u> , Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, <u>Gi M</u> , Wongpoomchai R, <u>Wanibuchi H</u> .	Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis.	Cancers (Basel)	13		2021
Kachi K, <u>Kato H</u> , Naiki-Ito A, Komura M, Nagano-Matsuo A, Naitoh I, Hayashi K, Kataoka H, Inaguma S, Takahashi S.	Anti-Allergic Drug Suppresses Pancreatic Carcinogenesis via Down-Regulation of Cellular Proliferation.	Int J Mol Sci	22		2021
Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, <u>Suzuki S</u> , Yabata H, Koizumi R, Moriyo shi H, Yazawa I.	Selective extension of cerebral vascular calcification in an autopsy case of Fahr's syndrome associated with asymptomatic hypoparathyroidism.	Neuropathology	41	387-95	2021
Isobe T, Naiki T, Naiki-Ito A, Kawai T, Etani T, Nagai T, Nozaki S, Kobayakawa Y, Iwatsuki S, Matsuyama N, <u>Kato H</u> , Kawai N, Yasui T.	Rare case of immunoglobulin G4-related disease arising in gonadal glands with long-term remission without steroid treatment: Discussion and literature review.	IJU Case Rep.	4	188-91	2021
Aoyama Y, Naiki-Ito A, Xiaochen K, Komura M, <u>Kato H</u> , Nagayasu Y, Inaguma S, Tsuda H, Tomita M, Matsuo Y, Takiguchi S, Takahashi S.	Lactoferrin Prevents Hepatic Injury and Fibrosis via the Inhibition of NF-kappaB Signaling in a Rat Non-Alcoholic Steatohepatitis Model.	Nutrients	14		2021

令和4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3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) 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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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 type="checkbox"/>	大阪市立大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

#### その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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4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3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) 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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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 type="checkbox"/>	大阪市立大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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4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3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) 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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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 type="checkbox"/>	大阪市立大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

#### その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。



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 笥 善行

次の職員の令和3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) 香川大学医学部医学教育学講座・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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4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3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 (所属部署・職名) 大学院医学研究科・講師  
(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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 4年 5月 2日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 日本大学薬学部

所属研究機関長 職 名 学部長

氏 名 鳥山 正晴

次の職員の令和3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) 日本大学薬学部・環境衛生学・教授  
(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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。