

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4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鰐淵 英機

令和5年（2023）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	----- 13
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	----- 17
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	----- 20
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	----- 24
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	----- 28
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	----- 31
魏 民	
7. DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価	----- 34
戸塚ゆ加里	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 40

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 大阪公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、本年度は新たに優先評価物質6種類を含む合計10種について、ラット28日間反復投与試験に基づき投与した肝臓における遺伝子発現をマイクロアレイにより取得した。併せて、これまでに構築した非遺伝毒性肝発がん物質検出モデルの改良を行い、その肝発がん性予測精度の検証を行った。その結果、これまでに解析した89物質に対して、3つの異なる発がん機序ごとにモデルを作成し、その成果を統合するモデル（機序別統合モデル）は、感度64%、特異度94%、正答率が82%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。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、これまでに開発した検出モデル-1では、遺伝毒性肝発がん物質を感度83%及び特異度95%で検出できた。本年度は、これまでの検出モデル-1を用いた検討において偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質の5種類について新たな肝発がん検出モデル-2を作成し検討した。その結果、新モデル作成に用いた2物質及び2つの陽性と判定された物質の合計4物質が陽性判定とされるモデル構築が出来た。我々の開発した2つの検出モデルを組み合わせて用いることで、遺伝毒性肝発がん物質を感度97%及び特異度95%と、高い精度で検出可能である。また、DNAアダクトーム解析による評価では、毒性予測モデルの更なる正答率向上に向け、毒性予測モデルの実用性の観点から、標準化したデータを用い、遺伝毒性予測ラベルと発がん性予測ラベルを作成し、ランダムフォレスト(RF)と線形判別分析(LDA)及びLeave-One-Out交差検証による機械学習手法により検討した結果、LDAによる結果がより良好で発がん性(83%)および遺伝毒性(65%)を予測するモデルが作成できた。

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 大阪公立大学 分子病理学 准教授
魏 民 大阪公立大学 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及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・安心に繋がる。

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

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

「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年度には陽性対照化学物質3つを含む16化学物質を、令和3年度に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。その結果、これまでに解析した79化学物質について、従来モデルでは感度41%(13/32物質)、特異度100%(47/47)と感度が低いため、新規に14遺伝子モデルを作成し感度59%(19/32物質)、特異度98%(46/47)と感度の改善を認めた。しかしながら、まだ感度が6割程度と低いため高感受性モデルを作成し、感度69%(22/32物質)、特異度85%(40/47)と感度が7割と高いモデル作成に成功した一方で、特異度の低下を認めた。

令和4年度は、「優先評価化学物質」を5つ含む新たな10化学物質について検討するとともに、2つの非遺伝毒性肝発がん物質について、投与濃度による陽性判定について検証した。また、精度向上を目指して、発がん機序ごとに判定モデルを確立し、それらを統合して判定するモデル(機序別統合モデル)を作成し検証を行った(大阪公立大/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2~3年度は、遺伝毒性発がん物質の検出に本モデル(検出モデル-1)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投与用量を上げて再検討を実施したものの、陰性と判定された。そこで令和4年度は、偽陰性となった物質を陽性と判定出来る新たなモデル(検出モデル-2)構築を試み検証した(大阪公立大/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、大阪公立大/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し肝臓を採取した。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)を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ごとの遺伝子発現変化データを取得した。得られた遺伝子発現変化のうち、以前に非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた106遺伝子セットを用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出(サポートベクターマシン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、検出法の感度及び特異度について検証した。

また、新たな遺伝子セットを検討するため、以前と同様に細胞傷害(TAA、MP)や酵素誘導(PB、HCB)、PPAR

αアゴニスト(CFB、WY)に属する化学物質2種において、共通して対照群との発現差がWelch T値が5以上となる遺伝子を選出した。次にそれぞれの属する化学物質において対照群との平均した発現差が4倍以上異なるとともに、42の非発がん物質で発現変動平均が0.5以下となる遺伝子を選出した。加えて、選出した遺伝子が、各所属化学物質の8割以上で変化するとともに、非発がん物質において2倍以上変化する物質が4つ以下となる遺伝子を選出した(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)。

新たな遺伝子セットを作成するため、細胞傷害(TAA、MP)や酵素誘導(PB、HCB)、PPARαアゴニスト(CFB、WY)に属する2種の化学物質において、高用量および中間用量を投与した群と対照群との発現差がWelch T値で5以上となる遺伝子を選んだ後に各2種の化学物質で共通する遺伝子を選出した。次にそれぞれの属する化学物質の高用量投与群において、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2倍以下となる遺伝子を選出した。その結果、選出された細胞傷害4遺伝子や酵素誘導2遺伝子、PPARαアゴニスト18遺伝子が選出された。それぞれの遺伝子を用いて各発がん機序に対し陽性となる予測モデルを作成し、いずれかで陽性と判定された物質を陽性と判定する新たな予測モデルを構築した(機序別統合モデル)。

令和4年度は、「優先評価化学物質」を5つ含む新たな10化学物質について検討するとともに、2つの非遺伝毒性肝発がん物質について、投与濃度による陽性判定について検証した。

大阪公立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質3種:Monuron(MON; 3 g/kg)、Mirex(MIR; 100 mg/kg)、Safrole(SAF; 10→5 g/kg)、非肝発がん物質かつ優先評価化学物質であるEthylene glycol(EG; 40 g/kg)、Terephthalic acid(TPA; 30 g/kg)を混餌投与した。

香川大学担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質1種:Nitritotriacetic acid(NTA; 1 g/L)、非肝発がん物質かつ優先評価化学物質であるAcrylic acid(ACA; 5 g/L)、Triethanolamine(TEA; 20 g/L)を飲水投与した。

国立衛研担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質であるFuranを3, 10, 30 mg/kgで、非肝発がん物質かつ優先評価化学物質であるEthyl acrylate(EAL; 200 mg/kg)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かつ優先評価化学物質であるBis(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)を5, 15, 50 g/kgで、非肝発がん物質かつ優先評価化学物質であるDimethyl terephthalate(DMT; 30 g/kg)を混餌投与した。

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)

新たな遺伝毒性肝発がん物質検出モデル-2 作成に用いた物質を表 1 に記す。これまでに行った 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で採取した肝組織から RNeasy mini kit (キアゲン) を用いて total RNA を抽出・精製し、GeneChip Clariom D Assay (Rat) 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、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 1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ) において対照群と 2 倍以上発現差がある共通遺伝子であるとともに、陰性対照である carbon tetrachloride (CCL4) で発現変動が異なる遺伝子を選出した。選出遺伝子の発現変動を基に、OPD および ADBAQ を陽性、CCL4 および平成 30 年度および令和 3 年度の対照群を陰性とする教師セットを用いて、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新たな遺伝毒性肝発がん物質の検出モデル-2 を作成した。

新たに作成した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル-2 に、2-Nitropropane (2NP)、Vinyl bromide (VB)、*o*-phenylenediamine (OPD)、4,4'-Diaminodiphenyl ether (ODA)、Disperse Blue 134 (DB-134) 及び Safrole の遺伝子発現結果を入力し、判定を行った。

表1. 新たな遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた検討

被験物質	分類	TD50 (mg/kg)	LD50 (mg/kg)	投与量 (mg/kg)	判定結果 (新モデル)	正否
2-Nitropropane (2-NP)	遺伝毒性 肝発がん物質	不明	不明	240	陰性	不正解
Vinyl bromide (VB)	遺伝毒性 肝発がん物質	18.5	500	170	陽性	正解
CCL4	非遺伝毒性 肝発がん物質	27.8	2350	780	陰性	正解
Disperse Blue 134 (DB-134)	遺伝毒性 「発がん性不明」	不明	不明	2000*	陰性	不明
<i>o</i> -phenylenediamine (OPD)	遺伝毒性 肝発がん物質	不明	510	510	陽性	正解
Safrole	遺伝毒性 肝発がん物質	441	1950	1950	陽性	正解
1-Amino-2,4- dibromoanthraquinone (ADBAQ)	遺伝毒性 肝発がん物質	46	不明	2000*	陽性	正解
4,4'-Diaminodiphenyl ether (ODA)	遺伝毒性 肝発がん物質	9.51	725	480	陰性	不正解

*OECD TG420 急性経口毒性試験において定められる最高用量

3. DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価 (鰐淵、戸塚)

今年度は、課題 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」で得られた非遺伝毒性肝発がん物質 4 種 (EE, MCT, PB, CCL4)、遺伝毒性肝発がん物質 4 種 (4,4'-ODA, NEMA, ETU, MDA)、遺伝毒性非肝発がん物質 2 種 (CPA, DNT)、非遺伝毒性非肝発がん物質 4 種 (AA, TEO, CHL, PhB) について、再度 HRAM-アダクトーム解析を行なったデータを用いて検討を行った。

抽出した DNA を、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。

昨年までの結果から、PCA-DA のクラスタリング傾向と毒性予測モデルの正答率の乖離があることがわかった。そこで原因を究明するために、ランダムフォレスト (RF) の過学習があるのではないかと予測し、これを検証するため自由度の低い学習アルゴリズム (線形判別分析 (LDA)) を用いて物質毎・サンプル毎の leave-One-Out 交差検証 (LOOCV) の検討を実施した。また、毒性予測モデルの実用性の観点から遺伝毒性のみの遺伝毒性予測ラベル (遺伝毒性「+」or「-」) と発がん性のみの発がん性予測ラベル (発がん性「+」or「-」) を作成し、それぞれの予測モデルの検討を実施した。

(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)

実験開始1週間後に SAF 群において体重減少を認めたため、2週目から10から5 g/kgへ投与濃度を下げて実験を継続した。また、実験期間中に DHEP 50 g/kg 投与群で著明な体重減少が見られ、実験23日目に1匹死亡を確認し、終屠殺時には対照群に比べ有意な体重減少を認めた。MON および SAF 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。

MON 投与群において肝重量の有意な低下、MIR および SAF 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。Furan 投与群では用量依存性の肝重量増加が認められ、10、30 mg/kg 投与群における肝相対重量の有意な増加に加え、高用量群では肝絶対重量の増加も観察された。DEHP 投与群の5、15 mg/kg 投与群において肝重量増加を認め、いずれの投与量においても相対肝重量の有意な増加を認めた。

採取された肝組織について検討した結果、MIR、SAF、Furan、DEHP 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、MON においても軽度ながら肝細胞肥大などの組織学的変化が存在した。Furan および DEHP いずれにおいても組織学的変化は用量依存性を示した。

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 遺伝子で構成される従来モデルおよび、新たに開発した 14 遺伝子モデルにおいて、非遺伝毒性肝発がん物質 4 物質のうち SAF のみ (25%) 発がん物質として判定された。一方、非発がん物質 6 物質は、従来モデルでは全て陰性と判定されていたが、14 遺伝子モデルでは DMT のみ陽性と判定された。高感受性モデルでは、非遺伝毒性肝発がん物質 4 物質のうち MIR と SAF が陽性 (50%) となったが、非発がん物質のうち、TPA および DMT が陽性と判定された (表 2)。

表2. 各モデルによる令和4年度検討した物質の判定結果

投与物質	略名	発がん性	従来モデル		14遺伝子モデル		高感受性モデル	
			判定	成否	判定	成否	判定	成否
Monuron	MON	陽性	陰性	×	陰性	×	陰性	×
Mirex	MIR	陽性	陰性	×	陰性	×	陽性	○
Safrole	SAF	陽性	陽性	○	陽性	○	陽性	○
Nitrotriacetic acid	NTA	陽性	陰性	×	陰性	×	陰性	×
Ethylene glycol	EGL	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Terephthalic acid	TPA	陰性	陰性	○	陰性	○	陽性	×
Ethyl acrylate	EAL	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Acrylic acid	ACA	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Triethanolamine	TEA	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Dimethyl terephthalate	DMT	陰性	陰性	○	陽性	×	陽性	×

そこで、細胞傷害や酵素誘導、PPAR α アゴニストそれぞれの発がん機序に基づいたモデルを作成し構築した機序別統合モデルを用いた結果、細胞障害モデルでMONとSAFが、酵素誘導モデルでSAFが陽性と判定された。一方、非肝発がん物質は細胞傷害や酵素誘導モデルでは陰性と判定されたものの、PPAR α アゴニストモデルでDMTが陽性と判定された。以上から、総合評価として感度50%、特異度83%と判定された(表3)。

表3. 機序別統合モデルによる令和4年度検討した物質の判定結果

予測モデル	細胞傷害物質 検出モデル	酵素誘導物質 検出モデル	PPAR α アゴニスト 物質検出モデル	総合評価
感度	50% (2/4)	25% (1/4)	0% (0/4)	50% (2/4)
特異度	100% (6/6)	100% (6/6)	83% (5/6)	83% (5/6)
正答率	80% (8/10)	70% (7/10)	50% (5/10)	70% (7/10)

これまで検証した全ての89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4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%近く認める優秀なモデルではあるが、感度が50%近くと問題点が存在する。高感受性モデルは、感度が67%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4. これまでに検討した89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	39% (14/36)	53% (19/36)	67% (24/36)
特異度	100% (53/53)	96% (51/53)	83% (44/53)
正答率	75% (67/89)	79% (70/89)	76% (68/89)

そこで作成した機序別統合モデルでの結果を表5に示す。各予測モデルから陽性と判定された物質を統合し、感度64%と高感受性モデルに近い高感度を得られたとともに、特異度についても偽陽性判定を統合しても94%と高い値を維持しており、正答率も80%以上ある良いモデルが作成できた。

表5. 機序別統合モデルにおけるこれまでに検討した89物質の成績

予測モデル	細胞傷害物質 検出モデル	酵素誘導物質 検出モデル	PPAR α アゴニスト 物質検出モデル	総合評価
感度	28% (10/36)	44% (16/36)	19% (7/36)	64% (23/36)
特異度	98% (52/53)	98% (52/53)	98% (52/53)	94% (50/53)
正答率	70% (62/89)	76% (68/89)	66% (59/89)	82% (73/89)

非遺伝毒性発がん物質の一部について、投与濃度を下げて検討を行った結果、Furanについては従来モデルや14遺伝子モデルで高用量以下は陰性と判定された。一方、高感受性モデルでは陽性と判定されたことから、

高感受性モデルでは低い濃度から陽性と判定出来ることが示された。新しい機序別統合モデルでは、高用量のみ陽性と判定された。DEHPについては、いずれのモデルにおいても低用量から全て陽性と判定された(表6)。

表6. 各モデルによる投与濃度ごとの発がん性判定結果

予測モデル	Furan			DEHP		
	Low	Middle	High	Low	Middle	High
従来モデル	×	×	○	○	○	○
14遺伝子モデル	×	×	○	○	○	○
高感受性モデル	○	○	○	○	○	○
機序別統合モデル	×	×	○	○	○	○

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

網羅的遺伝子発現解析で取得した遺伝子発現データを新規の遺伝毒性肝発がん物質検出モデル-2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、VB及びSafroleが陽性と判定された。教師セットとして用いたOPD及びDBAQに合わせて、5つの遺伝毒性発がん物質のうち4つが陽性(OPD、ADBAQ、VB及びSafrole)となる新しい遺伝子セットによるモデルが確立できた(表1)。一方、2NP、ODA、及びDB-134は陰性と判定された。

3. DNAアダクトーム解析による遺伝毒性評価(鰐淵、戸塚)

まず物質毎のLOOCVの検討を行った結果、全66サンプルのうち23サンプルについて正答した(平均的な正答率35%)。毒性別の平均的な正答率は、「-」は90%、「-+」10%、「+-」0%、「++」18%であった。また、PCA-DAの「-+」と「++」は一部のクラスターが重なっており、毒性予測モデルでも「-+」の物質をLOOCVでテストしたとき「++」に誤答する傾向があり、同様に「++」の物質をLOOCVでテストしたとき「-+」に誤答する傾向が見られた(表7、図1)。

表7. 物質毎の正答率

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	1	5	0.2	3	0	1	1
EE	++	2019	0	5	0	5	0	0	0
MCT	++	2018	1	5	0.2	2	0	1	2
PB	++	2018	0	5	0	1	0	0	4
GPA	+-	2018	0	5	0	0	0	4	1
DNT	+-	2019	0	4	0	3	0	1	0
44-ODA	++	2019	1	5	0.2	1	0	3	1
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			23	66	0.35				

次にサンプル毎のLOOCVの検討を行った結果、全66サンプルのうち31サンプルについて正答した(平均的な正答率47%)。毒性別の平均的な正答率は、「-」は90%(物質毎のLOOCVと変化なし)、「-+」は45%(物質毎のLOOCVよりも35ポイント増加)、「+-」は0%(物質毎のLOOCVと変化なし)、「++」は24%(物質毎のLOOCVよりも6ポイント増加)であった。また、PCA-DA(図2)

でクラスターの一部分が重なった「-+」と「++」について、物質毎のLOOCVよりも「-+」は正答率が向上（10%→45%）、同様に「++」も正答率が向上（18%→24%）した（表8）。なお、すべて誤答した「+-」は正答率の変化は確認できなかった。

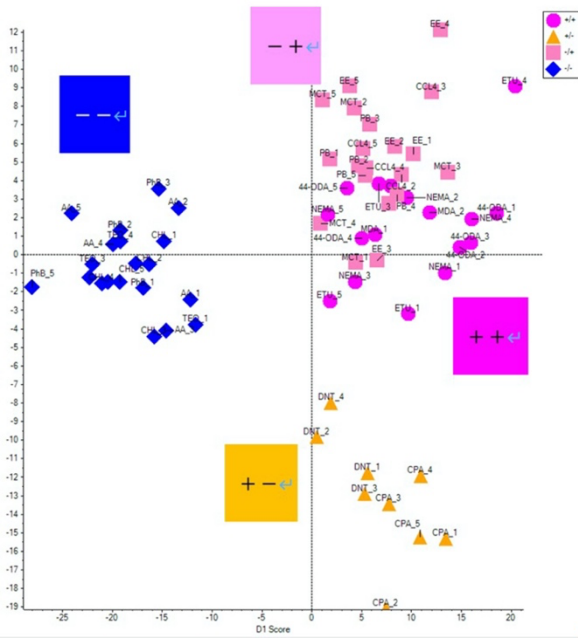


図1. 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価（PCA-DAによる）

表8. サンプル毎の正答率

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				

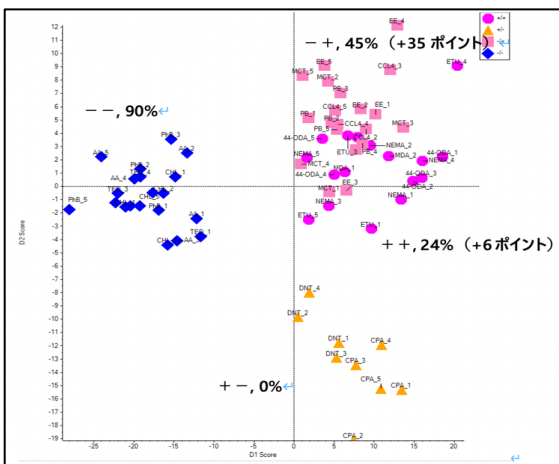


図2. サンプル毎の分類クラス別正答率。括弧内の数値は物質毎の正答率からの変化

② 毒性予測ラベルの変更による予測精度向上の検討

毒性予測モデルの正答率向上に向けて、毒性予測モデルの実用性の観点から遺伝毒性のみの毒性予測ラベル（遺伝毒性「+」or「-」）と発がん性のみの毒性予測ラベル（発がん性「+」or「-」）を作成し、毒性予測モデルの検討を実施した。

・ 遺伝毒性のみを用いた毒性予測モデル

2018年度測定データ、2019年度測定データ、2021年度測定データについて、毒性予測ラベルに遺伝毒性のみを用いた毒性予測モデルを構築・評価した（表9）。その結果、ランダムフォレスト（RF）と線形判別分析（LDA）の正答率は同程度であり、測定データと学習アルゴリズムに関係なく、正答率は物質別LOOCVよりもサンプル別LOOCVの方が高かった。また、2018年と2019年データを統合した2021年度データの正答率は、遺伝毒性と発がん性（「++」「+-」「-+」「--」の4種類の毒性予測ラベル）を組み合わせて用いた場合よりも約20ポイント向上した。

表9. 遺伝毒性のみを予測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	0.90	0.94	0.47	0.69	0.53	0.59
LDA	0.89	0.91	0.44	0.55	0.59	0.65

・ 発がん性のみを用いた毒性予測モデル

2018年度測定データ、2019年度測定データ、2021年度測定データについて、毒性予測ラベルに発がん性のみを用いた毒性予測モデルを構築・評価した（表10）。

その結果、遺伝毒性のみを用いた場合と同様に、RFとLDAの正答率は同程度であった。ただし、2021年度測定データはRFよりもLDAの方が正答率は約30ポイント高くなった。また、測定データと学習アルゴリズムに関係なく、正答率はおおよそ物質別LOOCVよりもサンプル別LOOCVの方が高かった。一方、2021年度データの正答率は、物質毎、サンプル毎のLOOCVに関わらず、LDAによる毒性予測結果は83%であった。

表10. 遺伝毒性のみを予測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	0.92	0.97	0.55	0.70	0.53	0.59
LDA	0.89	0.95	0.60	0.72	0.83	0.83

③ 5-methyl-dC によるデータの標準化

2018年測定データと2019年度測定データを合わせ、5-methyl-dCを内部標準としてnormalizeを行った。そのピークリストを用いてPCA-DA解析を行なった結果、一部の「++」と「--」は分離しなかったが、「+-」はクラスタリングされることがわかった（図3）。

さらに、毒性予測モデルの更なる正答率向上に向け、毒性予測モデルの実用性の観点から、標準化したデータを用い、遺伝毒性のみの毒性予測ラベル（遺伝毒性「+」or「-」）と発がん性のみの毒性予測ラベル（発

がん性「+」or「-」)を作成し、毒性予測モデルの検討を実施した。遺伝毒性のみの毒性(遺伝毒性「+」or「-」)と発がん性のみの毒性(発がん性「+」or「-」)に分けたPCA-DA解析の結果、遺伝毒性ではデータが分離されなかったが(図4)、発がん性では「+」と「-」で分離される傾向にあることがわかった(図5)。

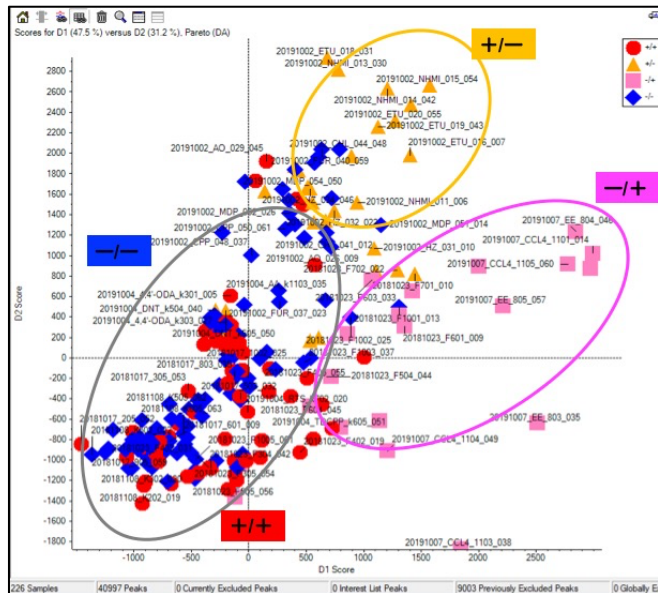


図3. 5-methyl-dCによる標準化とPCA-DA解析

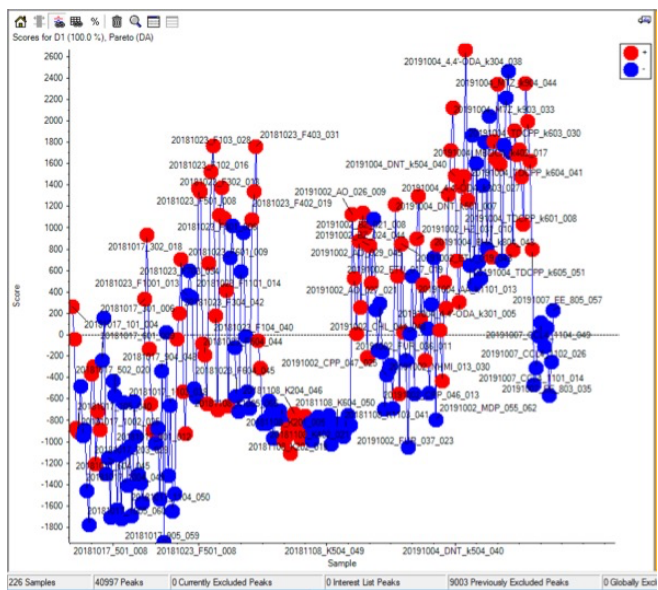


図4. 遺伝毒性の有無による分類

D. 考察

これまでに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5割近くと、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、高感受性モデルを開発したが、特異度が低下しており改善する必要があった。今年度が開発した発がん機序ごとに構築したモデルを組み合わせて作成した機序別統合モデルは、高感受性モデルに近い感受性を認めるとともに、特異度は以前のモデルと遜色ない結果が得られ、高精度のモデルが開発できたと考えられる。

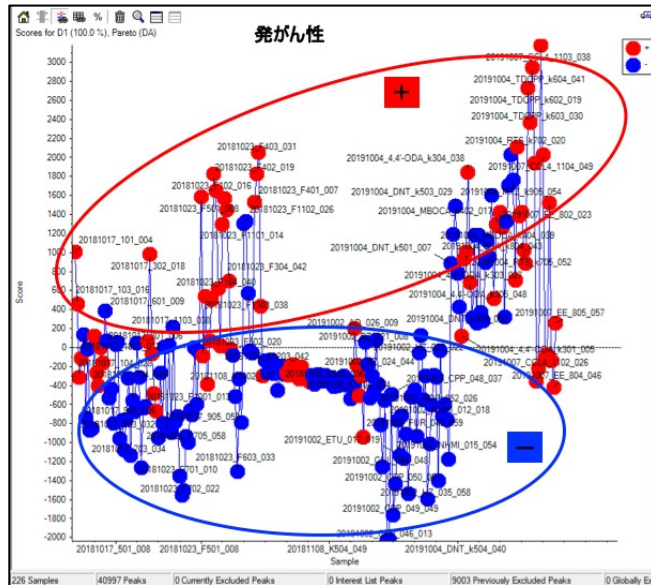


図5. 発がん性の有無による分類

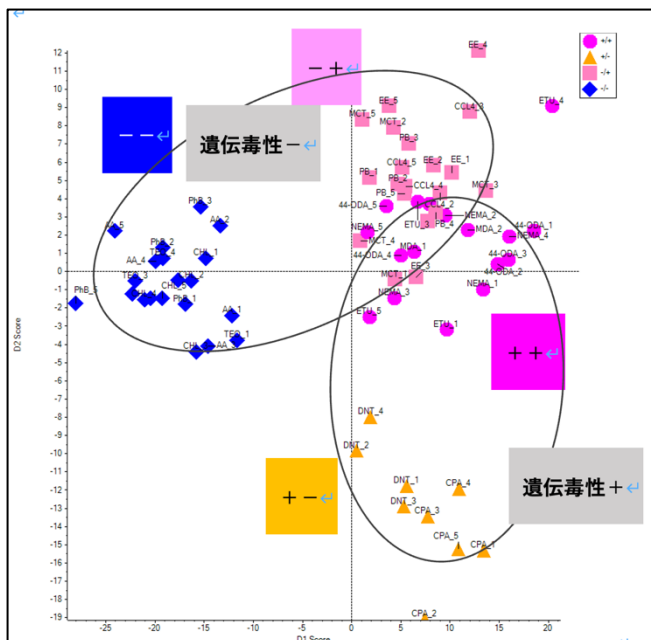


図6. 2021年度測定データのPCA-DA(遺伝毒性)

また、投与濃度による陽性判定検証では、従来モデルや14遺伝子モデルでは高濃度投与でしか陽性判定が出なかった一方で、高感受性モデルでは低用量でも陽性となったことは、モデル作成に起因すると考えられた。新たに作成した機序別統合モデルは、高感受性モデルほど低濃度での感度が高くない可能性を示した。

今回新たに作成した検出モデル-2において、5つの遺伝毒性発がん物質のうち4つが陽性となったことから、これまでに偽陰性となった遺伝毒性発がん物質には共通した発がん機序が存在する可能性が見られた。加えて、今までのモデルで陽性対照群として用いてきた2-NPが陰性となったことから既存の検出モデル-1とは異なる発がん機序である可能性を示した。また、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、我々の開発した2つの検出モデルを組み合わせて用いることで、遺伝毒性肝発がん物質を感度97%及び特異度95%と、高い精度で検出可能である。

2021年度測定データについて LDA を用いた遺伝毒性のみの予測結果 (59%-65%) と発がん性のみの予測結果 (83%) を比較すると、発がん性のみを予測した方が正答率は高かった。その理由として、遺伝毒性のみを予測した場合には「-」と「+」が明確に分離していないこと (図6) に対して、発がん性のみを予測した場合には「-」と「+」が比較的に分離していること (図7) に起因すると考えられる。

今年度、2018年データセットと2019年データセットを統合し、5-methyl-dC のピークを内部標準として標準化を行った。PCA-DA 解析を行ったところ、遺伝毒性と発がん性 (「++」「+-」「-+」「--」) のうち、「+-」、「-+」、それ以外、とクラスタリングできた。「++」と「--」の分離ができなかったが、保持時間や質量数の許容度など解析ソフトの条件の変更や、5-methyl-dC 以外の内部標準での標準化を試み、より精度よく分離ができる方法を検討する必要がある。

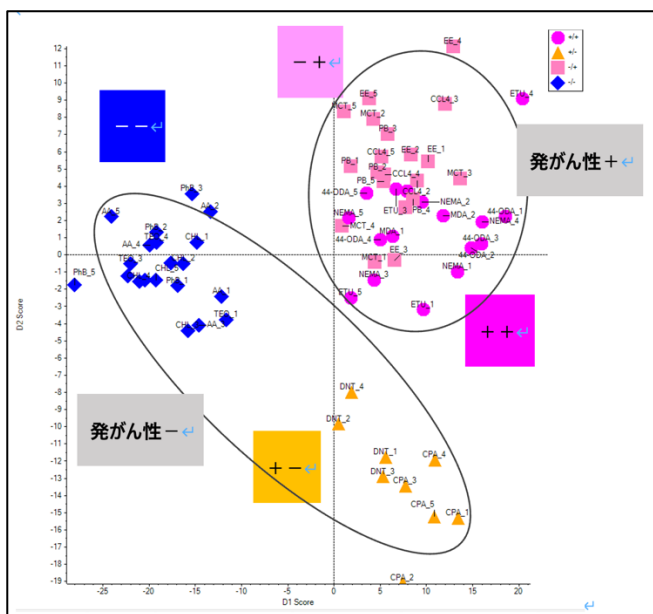


図7. 2021年度測定データのPCA-DA (発がん性)

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。今年度作成した機序別統合モデルは、今まで問題となっていた感度に対して向上する成果を出すとともに、特異度も高水準を保持しており、高い精度のモデルが開発できたと考えている。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、モデル作成に用いた遺伝子から肝発がん機序解明を目指したい。

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および新規モデルを組み合わせて用い

ることで、遺伝毒性肝発がん物質を極めて高い精度で検出できる可能性が示唆された。

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。

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) Toyoda T, Sone M, Matsushita K, Akane H, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Cho YM, Ogawa K. Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX. J Toxicol Sci. in press
- 2) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Suzuki S, Oishi Y, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks. J Toxicol Pathol. 2023; 36: 123-9.
- 3) Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. Toxicology. 2023; 488: 153483.
- 4) Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. Food Chem Toxicol. 2023; 175: 113702.
- 5) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Cho YM, Ogawa K. Persistent γ -H2AX formation and expression of stem cell markers in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. Toxicol Sci. 2022; 189: 51-61.
- 6) 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.
- 7) Uemoto Y, Katsuta E, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Hisada T, Terada M, Kato A, Okuda K, Sugiura H, Komura M, Kato H, Osaga S, Takahashi S, Toyama T. Low HECTD1 mRNA expression is associated with poor prognosis and may be correlated with increased mitochondrial respiratory function in breast cancer. Am J Cancer Res. 2022; 12: 1593-605.
- 8) Toyoda T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by

- immunohistochemistry for γ -H2AX: a review from analyses of 100 chemicals. *J Toxicol Pathol.* 2022; 35: 283–98.
- 9) Toyoda T, Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from o-toluidine and o-anisidine after 28-day oral administration to rats. *J Toxicol Sci.* 2022; 47: 457–66.
 - 10) 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.
 - 11) 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. *Journal of Toxicologic Pathology.* 2022; 35: 247–54.
 - 12) 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.
 - 13) Ozeki T, Shimura T, Ozeki T, Ebi M, Iwasaki H, Kato H, Inaguma S, Okuda Y, Katano T, Nishie H, Takahashi S, Kataoka H. The Risk Analyses of Lymph Node Metastasis and Recurrence for Submucosal Invasive Colorectal Cancer: Novel Criteria to Skip Completion Surgery. *Cancers (Basel).* 2022; 14.
 - 14) Oikawa D, Gi M, Kosako H, Shimizu K, Takahashi H, Shiota M, Hosomi S, Komakura K, Wanibuchi H, Tsuruta D, Sawasaki T, Tokunaga F. OTUD1 deubiquitinase regulates NF-kappaB- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways. *Cell Death Dis.* 2022; 13: 694.
 - 15) Nishino T, Abe T, Kaneko M, Yokohira M, Yamakawa K, Imaida K, Konishi H. GAREM1 is involved in controlling body mass in mice and humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022; 628: 91–7.
 - 16) Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, SuGi Mura 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.
 - 17) Nagai M, Iemura K, Kikkawa T, Naher S, Hattori S, Hagihara H, Nagata KI, Anzawa H, Kugisaki R, Wanibuchi H, Abe T, Inoue K, Kinoshita K, Miyakawa T, Osumi N, Tanaka K. Deficiency of CHAMP1, a gene related to intellectual disability, causes impaired neuronal development and a mild behavioural phenotype. *Brain Commun.* 2022; 4: fcac220.
 - 18) Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, Suzuki S, Fujioka M, Kakehashi A, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling. *Cancer Sci.* 2022; 113: 2642–53.
 - 19) Kondo N, Sakurai Y, Takata T, Kano K, Kume K, Maeda M, Takai N, Suzuki S, Eto F, Kikushima K, Wanibuchi H, Miyatake SI, Kajihara T, Oda S, Setou M, Aoki J, Suzuki M. Persistent elevation of lysophosphatidylcholine promotes radiation brain necrosis with microglial recruitment by P2RX4 activation. *Sci Rep.* 2022; 12: 8718.
 - 20) Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic homo- and hetero-dimers of o-toluidine, o-anisidine, and aniline formed by in vitro metabolism. *Chem Res Toxicol.* 2022; 35: 1625–30.
 - 21) Kato A, Naitoh I, Naiki-Ito A, Hayashi K, Okumura F, Fujita Y, Sano H, Nishi Y, Miyabe K, Inoue T, Hirano A, Takada H, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Kato H, Takahashi S, Kataoka H. Class III beta-Tubulin Expression Is of Value in Selecting nab-Paclitaxel and Gemcitabine as First-Line Therapy in Unresectable Pancreatic Cancer. *Pancreas.* 2022; 51: 372–9.
 - 22) Kato A, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Hisada T, Uemoto Y, Terada M, Kato H, Komura M, Okuda K, Takahashi S, Toyama T. Low TINAGL1 expression is a marker for poor prognosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2022.
 - 23) Kato A, Kato H, Naitoh I, Hayashi K, Yoshida M, Hori Y, Kachi K, Asano G, Sahashi H, Toyohara T, Kuno K, Kito Y, Takahashi S, Kataoka H. Use of Endoscopic Scraper and Cell Block Technique as a Replacement for Conventional Brush for Diagnosing Malignant Biliary Strictures. *Cancers (Basel).* 2022; 14.

- 24) Hisada T, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Osaga S, Fujita T, Asano T, Uemoto Y, Nishikawa S, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Sugiura H, Okuda K, Kato H, Komura M, Morita S, Takahashi S, Toyama T. Co-expression effect of LLGL2 and SLC7A5 to predict prognosis in ERalpha-positive breast cancer. *Sci Rep.* 2022; 12: 16515.
- 25) Deguchi S, Tanaka H, Suzuki S, Natsuki S, Mori T, Miki Y, Yoshii M, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Clinical relevance of tertiary lymphoid structures in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2022; 22: 699.
- 26) Chlopek M, Lasota J, Thompson LDR, Szczepaniak M, Kuzniacka A, Hincza K, Kubicka K, Kaczorowski M, Newford M, Liu Y, Agaimy A, Biernat W, Durzynska M, Dziuba I, Hartmann A, Inaguma S, Izycka-Swieszewska E, Kato H, Kopczynski J, Michal M, Michal M, Peksa R, Prochorec-Sobieszek M, Starzynska A, Takahashi S, Wasag B, Kowalik A, Miettinen M. Alterations in key signaling pathways in sinonasal tract melanoma. A molecular genetics and immunohistochemical study of 90 cases and comprehensive review of the literature. *Mod Pathol.* 2022; 35: 1609-17.
- 27) 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.
- 28) Arakawa N, Ushiki A, Abe M, Matsuyama S, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Miyashita K, Saito K, Nakamura R, Toyoda T, Ogawa K, Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiya T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M. Stratifin as a novel diagnostic biomarker in serum for diffuse alveolar damage. *Nat Commun.* 2022; 13: 5854.
- 29) 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; 42 (10):1603-17.
2. 学会発表
- 1) 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類の尿中代謝物と膀胱尿路上皮への影響. 第111回日本病理学会総会、神戸 (2022年4月)
- 2) 梯アンナ、鈴木周五、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける新規標的分子ターゲットとしてのCanopy homolog 2の役割. 第111回日本病理学会総会、神戸 (2022年4月)
- 3) 加藤寛之、小村理行、内木綾、稲熊真悟、高橋智. 全身性ヘモクロマトーシスを伴う有口赤血球症の1割検例. 第111回日本病理学会総会、神戸 (2022年4月)
- 4) 森川朋美、豊田武士、赤根弘敏、松下幸平、小川久美子. ラットを用いたオリゴガラクチュロン酸の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28回総会・学術大会、東京 (2022年5月)
- 5) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. AKIからCKDへの移行におけるCD44の役割とバイオマーカーとしての応用. 第65回日本腎臓学会学術総会、神戸 (2022年6月)
- 6) 鰐淵英機. ヒ素による発がん機序の解明. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年6月)
- 7) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによる化学物質の遺伝毒性評価の現状と将来展望. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年6月)
- 8) 鰐淵英機. 有機ヒ素化合物の長期毒性・発がん性機序の研究. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
- 9) 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o-toluidineの尿中代謝物と膀胱尿路上皮への影響. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
- 10) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 1,4-ジオキサン肝発がん機序の解明と定量的発がんリスク評価. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
- 11) 豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. γ -H2AXを指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
- 12) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ナノサイズ酸化チタン(IV)の毒性研究. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
- 13) 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. 甲状腺ホルモン代謝促進物質投与ラットにおける抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
- 14) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. アロプリノール誘発腎線維化モデルラットを用いたCD44の腎線維化バイオマーカーとしての有用性の検証. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
- 15) 小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析. 第29回日本がん予防学術大会、京都 (2022年7月)

- 月)
- 16) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、赤根弘敏、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。細胞毒性を有するo-Toluidineとo-Anisidineの尿中代謝物はラット膀胱上皮でALDH1A1を誘導する。第29回日本がん予防学術大会、京都 (2022年7月)
 - 17) 加藤寛之、内木綾、小村理行、稲熊真悟、高橋智。DPYD and STAT3 pathways are inhibited by luteolin and show interdependent expression in pancreatic cancer. The 7th JCA-AACR Special Joint Conference、京都 (2022年7月)
 - 18) Kobayashi T, Yoshioka Y, Kishimoto S, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. In vitro metabolic dynamics for p-semidine-type homo- and hetero-dimerization of monocyclic aromatic amines. 13th International Conference on Environmental Mutagens, Ottawa (2022年8月)
 - 19) Kobayashi T, Toyoda T, Yoshioka Y, Murai N, Kishimoto S, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic metabolites of o-toluidine and o-anisidine induce ALDH1A1 in rat bladder epithelium. 13th International Conference on Environmental Mutagens, Ottawa (2022年8月)
 - 20) Totsuka Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. 13th International Conference on Environmental Mutagens, Ottawa (2022年8月)
 - 21) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。薬剤性腎障害から慢性腎臓病への移行を予測するバイオマーカーの探索。第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京 (2022年8月)
 - 22) 岡本悠佑、福井千恵、赤根弘敏、豊田武士、梶山健次、権英淑、神山文男、小川久美子、伊豆津健一、山本栄一、野村祐介。コーティング型マイクロニードルアレイにおける穿刺性及び薬剤透過性の評価、第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京 (2022年8月)
 - 23) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機。芳香族アミンによる職業性膀胱がん。第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
 - 24) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里。職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析。第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
 - 25) 魏民、鈴木周五、山下聡、藤岡正喜、梯アンナ、山本与毅、邱桂ユウ、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81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
 - 26) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、邱桂ユウ、梯アンナ、鰐淵英機。マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進。第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
 - 27) 戸塚ゆ加里、小宮雅美、松田知成、加藤護。Next generation sequencing technology elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
 - 28) 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里。Establishment of novel genotoxicity assay system using organoids derived from murine normal epithelial tissues. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
 - 29) 豊田武士、赤根弘敏、小川久美子。化学物質誘発ラット膀胱腫瘍の発生過程におけるγ-H2AXの役割。第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
 - 30) 赤根弘敏、豊田武士、小川久美子。ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的手法による抗甲状腺物質の検出。第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
 - 31) 赤木純一、豊田武士、小川久美子。γ-H2AXとの組み合わせによる肝発癌物質検出のためのバイオマーカーとしてのEpCAMおよびアミノペプチダーゼNの有用性。第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
 - 32) 増田寛喜、豊田武士、宮下知治、吉田寛、瀬戸泰之、野村幸世。ラット外科的逆流モデルにおけるバレット食道に対するMEKインヒビターの治療効果の検討。第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
 - 33) 加藤寛之、内木綾、稲熊真悟、小村理行、高橋智。The role of dipyrimidine dehydrogenase in pancreatic cancer. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
 - 34) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、邱桂鈺、芝野佳奈、鰐淵英機。マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物の発がん性およびその機序。第35回発癌病理研究会、湯沢 (2022年11月)
 - 35) 戸塚ゆ加里、小宮雅美、永井桃子、加藤護、松田知成。集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望。第35回発癌病理研究会、湯沢 (2022年11月)
 - 36) 戸塚ゆ加里。集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望。第1回包括的がん緩和病態生理医療薬学研究会、東京 (2022年11月)
 - 37) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里。職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析。第51回環境変異原学会、広島 (2022年11月)
 - 38) 坪井理、植嶋亜衣、久富優太、小田美光、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜。DNA鎖間架橋修復欠損細胞を用いたコリバクチン産生大腸菌の細胞毒性と遺伝毒性の評価。第51回環境変異原学会、広島 (2022

- 年 11 月)
- 39) 岡本悠佑、福井千恵、赤根弘敏、豊田武士、梶山健次、権英淑、神山文男、小川久美子、伊豆津健一、山本栄一、野村祐介. コーティング型マイクロニードルアレイにおける高極性薬剤の皮膚透過性の評価. 第 44 回日本バイオマテリアル学会、東京 (2022 年 11 月)
 - 40) 増田寛喜、豊田武士、宮下知治、吉田寛、瀬戸泰之、野村幸世. ラット外科的逆流モデルにおけるバレット食道に対する MEK インヒビターの治療効果の検討. 第 33 回日本消化器癌発生学会総会、東京 (2022 年 11 月)
 - 41) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ナノサイズ二酸化チタンの 90 日間反復経口投与毒性. 第 59 回全国衛生化学技術協議会年会、川崎 (2022 年 11 月)
 - 42) 藤岡正喜、魏民、Vachiraarunwon Arpamas、鈴木周五、鰐淵英機. 無機ヒ素曝露ヒト肝マウスにおける尿中及び糞中ヒ素の化学形態別性状の解析. 第 27 回ヒ素シンポジウム、今治 (2022年12月)
 - 43) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸による膀胱発がん機序の解明. 第27回ヒ素シンポジウム、今治 (2022年12月)
 - 44) 魏民、藤岡正喜、鈴木周五、山本与毅、Vachiraarunwon Arpamas、梯アンナ、鰐淵英機. ヒ素誘発膀胱発がん過程における DNA メチル化異常の関与. 第 27 回ヒ素シンポジウム、今治 (2022 年 12 月)
 - 45) Totsuka Y. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development. 12th AACR-JCA Joint Conference, Maui (2022 年 12 月)
 - 46) 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病変における CD44 陽性尿細管の病態生理学的意義. 第 5 回医薬品毒性機序研究会、東京 (2022 年 12 月)
 - 47) 道場彩乃、魏民、櫻井映子、寺本 篤司、桐山諭和、山田 勢至、鰐淵英機、塚本徹哉. γ -H2AXとKi-67を用いた遺伝毒性肝発がん物質の早期検出:機械学習による自動判定の試み. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
 - 48) 山本与毅、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、Guiyu Qiu、芝野佳奈、清水一希、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱がんにおけるDNAメチル化異常. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
 - 49) Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Tohru Kiyono, Shugo Suzuki, Kana Shibano, Guiyu Qiu, Pharapirom Aroonrat, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Toxicities of various arsenicals on immortalized normal human bladder epithelial cells. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
 - 50) 梯アンナ、西土井悠作、Guiyu Qiu、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカー候補の解析. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
 - 51) Guiyu Qiu、梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌におけるPRDX3 の機能解明. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
 - 52) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、芝野佳奈、Guiyu Qiu、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
 - 53) 芝野佳奈、藤岡正喜、魏民、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、Guiyu Qiu、鈴木周五、鰐淵英機. ヒト化肝臓マウスにおける無機ヒ素の体内動態及び毒性. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
 - 54) 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 *o*-toluidine の尿中代謝物による膀胱尿路上皮への影響. 第 39 回日本毒性病理学会総会、東京 (2023 年 1 月)
 - 55) 豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. γ -H2AX 免疫染色を指標とした腎発がん性の短期評価法開発. 第 39 回日本毒性病理学会総会、東京 (2023 年 1 月)
 - 56) 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. ヨウ素取込み阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出指標としての病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値の比較. 第 39 回日本毒性病理学会総会、東京 (2023 年 1 月)
 - 57) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 腎線維化における部分的上皮間葉転換の生じた尿細管の役割と CD44 との関連. 第 39 回日本毒性病理学会総会、東京 (2023 年 1 月)
 - 58) Toyoda T., Yamada T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023 年 3 月)
 - 59) Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Akane H, Toyoda T. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023 年 3 月)
 - 60) Akane H, Toyoda T., Matsushita K, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Comparison of sensitivity between histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors

and promoters of thyroid hormone metabolism.
62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023年3月)

- 61) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. 結晶子径 6 nm の超微小粒子径アナターゼ型二酸化チタンナノ粒子の反復経口投与毒性. 日本薬学会第 143 年会、札幌 (2023 年 3 月)
- 62) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、渡邊正悟、岸本真治、松下幸平、赤根弘敏、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新規尿中代謝物はラット膀胱

上皮における ALDH1A1 の発現を誘導する. 日本農芸化学会 2023 年度大会、Web 開催 (2023 年 3 月)

H. 知的所有権の取得状況

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

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

分担研究項目：遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立

研究分担者 鰐淵 英機 大阪公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4年度は非遺伝毒性肝発がん物4種類と、非発がん物質6種類の合計10種および、非遺伝毒性肝発がん物2種の濃度依存性について検討した。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および14遺伝子モデルでは、感度25%(1/4物質)、特異度100%(6/6)と判定された。また、高感受性モデルでは感度50%(2/4物質)、特異度67%(4/6)と判定された。そこで、3つの異なる発がん機序ごとにモデルを作成し、その成果を統合するモデル（機序別統合モデル）を作成した結果、感度50%(2/4物質)、特異度83%(5/6)と改善された。新たに作成した機序別統合モデルは、以前の試験データによる解析と合わせて、感度64%、特異度94%、正答率が82%となる遺伝子セットが確立でき、非遺伝毒性肝発がん物質の検出法として有用であることを示した。

A. 研究目的

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

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

非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせ「遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」を確立したが、その検出力について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を使用して、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた106遺伝子セットから、共通の遺伝子として選出可能であった103遺伝子を用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出（サポートベクターマシンの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 α アゴニスト（CFB、WY）に属する化学物質2種において、共通して対照群との発現差がWelch T値が5以上となる遺伝子を選出した。次にそれぞれの属する化学物質において対照群との平均した発現差が4倍以上異なるとともに、42の非発がん物質で発現変動平均が0.5以下となる遺伝子を選出した。加えて、選出した遺伝子が、各所属化学物質の8割以上で変化するとともに、非発がん物質において2倍以上変化する物質が4つ以下となる遺伝子を選出した（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）。

新たな遺伝子セットを作成するため、細胞傷害（TAA、MP）や酵素誘導（PB、HCB）、PPAR α アゴニスト（CFB、WY）に属する2種の化学物質において、高用量および中間用量を投与した群と対照群との発現差がWelch T値で5以上となる遺伝子を選んだ後に各2種の化学物質で共通する遺伝子を選出した。次にそれぞれの属する化学物質の高用量投与群において、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2倍以下となる遺伝子を選出した。その結果、選出された細胞傷害4遺伝子や酵素誘導2遺伝子、PPAR α アゴニスト18遺伝子が選出された。それぞれの遺伝子を用いて各発がん機序に対し陽性となる予測モデルを作成し、いずれかで陽性と判定された物質を陽性と判定する新たな予測モデルを構築した（機序別統合モデル）。

本年度は、非遺伝毒性肝発がん物質4種：Monuron（MON）、Mirex（MIR）、Safrole（SAF）、Nitrilotriacetic acid（NTA）と、非肝発がん物質で優先評価物質に属する6種：Ethylene glycol（EGL）、Terephthalic acid（TPA）、Ethyl acrylate（EAL）、Acrylic acid（ACA）、Triethanolamine（TEA）、Dimethyl terephthalate（DMT）を用いた。また、投与濃度による陽性判定検証のため、非遺伝毒性肝発がん物質 Furan(3, 10, 30 mg/kg/day 強制胃内投与)および Bis(2-ethylhexyl) phthalate（DEHP; 5, 15, 50 g/kg 摂餌）について各投与濃度および方法で行った。

（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遺伝子で構成される従来モデルおよび、新たに開発した14遺伝子モデルにおいて、非遺伝毒性肝発がん物質4物質のうちSAFのみ(25%)発がん物質として判定された。一方、非発がん物質6物質は、従来モデルでは全て陰性と判定されていたが、14遺伝子モデルではDMTのみ陽性と判定された。高感受性モデルでは、非遺伝毒性肝発がん物質4物質のうちMIRとSAFが陽性(50%)となったが、非発がん物質のうち、TPAおよびDMTが陽性と判定された(表1)。

そこで、細胞傷害や酵素誘導、PPAR α アゴニストそれぞれの発がん機序に基づいたモデルを作成し構築した機序別統合モデルを用いた結果、細胞障害モデルでMONとSAFが、酵素誘導モデルでSAFが陽性と判定された。一方、非肝発がん物質は細胞傷害や酵素誘導モデルでは陰性と判定されたものの、PPAR α アゴニストモデルでDMTが陽性と判定された。以上から、総合評価として感度50%、特異度83%と判定された(表2)。

表1. 各モデルによる令和4年度検討した物質の判定結果

投与物質	略名	発がん性	従来モデル		14遺伝子モデル		高感受性モデル	
			判定	成否	判定	成否	判定	成否
Monuron	MON	陽性	陰性	×	陰性	×	陰性	×
Mirex	MIR	陽性	陰性	×	陰性	×	陽性	○
Safrole	SAF	陽性	陰性	○	陰性	○	陽性	○
Nitrilotriacetic acid	NTA	陽性	陰性	×	陰性	×	陰性	×
Ethylene glycol	EGL	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Terephthalic acid	TPA	陰性	陰性	○	陰性	○	陽性	×
Ethyl acrylate	EAL	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Acrylic acid	ACA	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Triethanolamine	TEA	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Dimethyl terephthalate	DMT	陰性	陰性	○	陽性	×	陽性	×

表2. 機序別統合モデルによる令和4年度検討した物質の判定結果

予測モデル	細胞傷害物質 検出モデル	酵素誘導物質 検出モデル	PPAR α アゴニスト 物質検出モデル	総合評価
感度	50% (2/4)	25% (1/4)	0% (0/4)	50% (2/4)
特異度	100% (6/6)	100% (6/6)	83% (5/6)	83% (5/6)
正答率	80% (8/10)	70% (7/10)	50% (5/10)	70% (7/10)

これまで検証した全ての89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3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%近く認める優秀なモデルではあるが、感度が50%近く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67%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3. これまでに検討した89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	39% (14/36)	53% (19/36)	67% (24/36)
特異度	100% (53/53)	96% (51/53)	83% (44/53)
正答率	75% (67/89)	79% (70/89)	76% (68/89)

そこで作成した機序別統合モデルでの結果を表4に示す。各予測モデルから陽性と判定された物質を統合し、感度64%と高感受性モデルに近い高感度を得られたとともに、特異度についても偽陽性判定を統合しても94%と高い値を維持しており、正答率も80%以上ある良いモデルが作成できた。

表4. 機序別統合モデルにおける89物質の成績

予測モデル	細胞傷害物質 検出モデル	酵素誘導物質 検出モデル	PPAR α アゴニスト 物質検出モデル	総合評価
感度	28% (10/36)	44% (16/36)	19% (7/36)	64% (23/36)
特異度	98% (52/53)	98% (52/53)	98% (52/53)	94% (50/53)
正答率	70% (62/89)	76% (68/89)	66% (59/89)	82% (73/89)

非遺伝毒性発がん物質の一部について、投与濃度を下げて検討を行った結果、Furanについては従来モデルや14遺伝子モデルで高用量以下は陰性と判定された。一方、高感受性モデルでは陽性と判定されたことから、高感受性モデルでは低い濃度から陽性と判定出来ることが示された。新しい機序別統合モデルでは、高用量のみ陽性と判定された。DEHPについては、いずれのモデルにおいても低用量から全て陽性と判定された(表5)。

表5. 各モデルによる投与濃度ごとの発がん性判定結果

予測モデル	Furan			DEHP		
	Low	Middle	High	Low	Middle	High
従来モデル	×	×	○	○	○	○
14遺伝子モデル	×	×	○	○	○	○
高感受性モデル	○	○	○	○	○	○
機序別統合モデル	×	×	○	○	○	○

D. 考察

これまでに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5割近くと、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、高感受性モデルを開発したが、特異度が低下しており改善する必要があった。発がん機序ごとに構築したモデルを組み合わせで作成した機序別統合モデルでは、高感受性モデルに近い感受性を認めるとともに、特異度は以前のモデルと遜色ない結果が得られた。

また、投与濃度による陽性判定検証では、従来モデルや14遺伝子モデルでは高濃度投与でしか陽性判定が出なかった一方で、高感受性モデルでは低用量でも要請となったことは、モデル作成に起因すると考えられた。新たに作成した機序別統合モデルは、高感受性モデルほど低濃度での感度が高くない可能性を示した。

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、感度64%、特異度94%、正答率82%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) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Suzuki S, Oishi Y, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks. *J Toxicol Pathol*. 2023; 36: 123-9.
- 2) Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. *o*-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology*. in press.
- 3) Oikawa D, Gi M, Kosako H, Shimizu K, Takahashi H, Shiota M, Hosomi S, Komakura K, Wanibuchi H, Tsuruta D, Sawasaki T, Tokunaga F. OTUD1 deubiquitinase regulates NF- κ B- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways. *Cell Death Dis*. 2022; 13: 694.
- 4) Nagai M, Iemura K, Kikkawa T, Naher S, Hattori S, Hagihara H, Nagata KI, Anzawa H, Kugisaki R, Wanibuchi H, Abe T, Inoue K, Kinoshita K, Miyakawa T, Osumi N, Tanaka K. Deficiency of CHAMP1, a gene related to intellectual disability, causes impaired neuronal development and a mild behavioural phenotype. *Brain Commun*. 2022; 4: fcac220.
- 5) 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.

- 6) Deguchi S, Tanaka H, Suzuki S, Natsuki S, Mori T, Miki Y, Yoshii M, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Clinical relevance of tertiary lymphoid structures in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2022; 22: 699.
 - 7) Kondo N, Sakurai Y, Takata T, Kano K, Kume K, Maeda M, Takai N, Suzuki S, Eto F, Kikushima K, Wanibuchi H, Miyatake SI, Kajihara T, Oda S, Setou M, Aoki J, Suzuki M. Persistent elevation of lysophosphatidylcholine promotes radiation brain necrosis with microglial recruitment by P2RX4 activation. *Sci Rep*. 2022; 12: 8718.
 - 8) Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, Suzuki S, Fujioka M, Kakehashi A, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling. *Cancer Sci*. 2022; 113: 2642-53.
 - 9) 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; 35: 247-54.
- ### 2. 学会発表
- 1) 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類の尿中代謝物と膀胱尿路上皮への影響. 第111回日本病理学会総会、神戸 (2022年4月)
 - 2) 梯アンナ、鈴木周五、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける新規標的分子ターゲットとしてのCanopy homolog 2の役割. 第111回日本病理学会総会、神戸 (2022年4月)
 - 3) 鰐淵英機. ヒ素による発がん機序の解明. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年6月)
 - 4) 鰐淵英機. 有機ヒ素化合物の長期毒性・発がん性機序の研究. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
 - 5) 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*o*-toluidineの尿中代謝物と膀胱尿路上皮への影響. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
 - 6) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 1,4-ジオキサンの肝発がん機序の解明と定量的発がんリスク評価. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
 - 7) 小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析. 第29回日本がん予防学術大会、京都 (2022年7月)

- 8) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機。芳香族アミンによる職業性膀胱がん。第81回日本癌学会学術総会、横浜（2022年9月）
- 9) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里。職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析。第81回日本癌学会学術総会、横浜（2022年9月）
- 10) 魏民、鈴木周五、山下聡、藤岡正喜、梯アンナ、山本与毅、邱桂ユウ、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81回日本癌学会学術総会、横浜（2022年9月）
- 11) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、邱桂ユウ、梯アンナ、鰐淵英機。マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進。第81回日本癌学会学術総会、横浜（2022年9月）
- 12) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、邱桂鈺、芝野佳奈、鰐淵英機。マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物の発がん性およびその機序。第35回発癌病理研究会、湯沢（2022年11月）
- 13) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里。職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析。第51回環境変異原学会、広島（2022年11月）
- 14) 藤岡正喜、魏民、Vachiraarunwon Arpamas、鈴木周五、鰐淵英機。無機ヒ素曝露ヒト肝マウスにおける尿中及び糞中ヒ素の化学形態別性状の解析。第27回ヒ素シンポジウム、今治（2022年12月）
- 15) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機。ジメチルアルシン酸による膀胱発がん機序の解明。第27回ヒ素シンポジウム、今治（2022年12月）
- 16) 魏民、藤岡正喜、鈴木周五、山本与毅、Vachiraarunwong Arpamas、梯アンナ、鰐淵英機。ヒ素誘発膀胱発がん過程におけるDNAメチル化異常の関与。第27回ヒ素シンポジウム、今治（2022年12月）
- 17) 道場彩乃、魏民、櫻井映子、寺本 篤司、桐山諭和、山田 勢至、鰐淵英機、塚本徹哉。γH2AXとKi-67を用いた遺伝毒性肝発がん物質の早期検出:機械学習による自動判定の試み。第39回日本毒性病理学会総会、東京（2023年1月）
- 18) 山本与毅、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、Guiyu Qiu、芝野佳奈、清水一希、梯アンナ、鰐淵英機。ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱がんにおけるDNAメチル化異常。第39回日本毒性病理学会総会、東京（2023年1月）
- 19) Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Tohru Kiyono, Shugo Suzuki, Kana Shibano, Guiyu Qiu, Pharapirom Aroonrat, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Toxicities of various arsenicals on immortalized normal human bladder epithelial cells. 第39回日本毒性病理学会総会、東京（2023年1月）
- 20) 梯アンナ、西土井悠作、Guiyu Qiu、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機。ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカー候補の解析。第39回日本毒性病理学会総会、東京（2023年1月）
- 21) Guiyu Qiu、梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機。ヒト浸潤性膵管癌におけるPRDX3の機能解明。第39回日本毒性病理学会総会、東京（2023年1月）
- 22) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、芝野佳奈、Guiyu Qiu、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機。マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進。第39回日本毒性病理学会総会、東京（2023年1月）
- 23) 芝野佳奈、藤岡正喜、魏民、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、Guiyu Qiu、鈴木周五、鰐淵英機。ヒト化肝臓マウスにおける無機ヒ素の体内動態及び毒性。第39回日本毒性病理学会総会、東京（2023年1月）
- 24) 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o-toluidineの尿中代謝物による膀胱尿路上皮への影響。第39回日本毒性病理学会総会、東京（2023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4年度分担研究報告書

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

分担研究項目：遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立

研究分担者 鈴木 周五 大阪公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4年度は、非遺伝毒性肝発がん物質3種および非肝発がん物質2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、従来の予測モデルおよび14遺伝子モデルにおいて、1物質が発がん物質と判定される一方で、高感受性モデルでは2物質が発がん物質と判定された。一方、非肝発がん物質は予測モデルおよび14遺伝子モデルでいずれも陰性と判定されたが、高感受性モデルでは1つが陽性と判定された。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・安心を保障する。

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、その検出力について動物実験を行い検証する。令和4年度は、新たに新規の非遺伝毒性肝発がん物質と、優先評価物質に属する非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ンの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。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。

大阪公立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質3種：Monuron (MON; 0.3%)、Mirex (MIR; 100 mg/kg)、Safrole (SAF; 1%→0.5%)および優先評価物質に属する非肝発がん物質2種：Ethylene glycol (EGL; 4%)、Terephthalic acid (TPA; 3%)を混餌投与した。

(倫理面への配慮)

大阪公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

実験開始1週間後にSAF群において体重減少を認めたため、2週目から1%から0.5%へ投与濃度を下げて実験を継続した。経過中にMONおよびSAF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、MON投与群において肝重量の有意な低下、MIRおよびSAF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	407.7 ± 21.1	16.4 ± 1.6	4.0 ± 0.2	23.7 ± 1.1	40.4 ± 2.3
MON	5	308.2 ± 20.7 ***	12.7 ± 1.8**	4.1 ± 0.3	15.7 ± 3.1	32.1 ± 2.7
MIR	5	412.9 ± 23.0	18.8 ± 1.8	4.6 ± 0.3*	25.4 ± 2.3	38.4 ± 3.1
SAF	5	337.8 ± 18.5 ***	18.7 ± 1.7	5.5 ± 0.2***	19.0 ± 5.9	32.5 ± 4.6
EGL	5	419.1 ± 41.8	16.9 ± 2.1	4.0 ± 0.2	26.4 ± 3.0	49.2 ± 7.3
TPA	5	391.8 ± 13.0	15.9 ± 0.8	4.1 ± 0.2	26.0 ± 2.8	48.3 ± 4.8

*, **, ***: P < 0.05, 0.01 and 0.001 vs Control, respectively

MON: Monuron; MIR: Mirex; SAF: Safrole; EGL: Ethylene glycol; TPA: Terephthalic acid

肝臓の組織学的検討した結果、MIR投与群でZone 3において肝細胞腫大と脂肪変性が存在した。SAF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。MON群においても、Zone 3での軽度の肝細胞腫大と胞体の淡明化が存在した。EGLおよびTPA投与群では、対照群との差ははっきりしなかった(図1)。

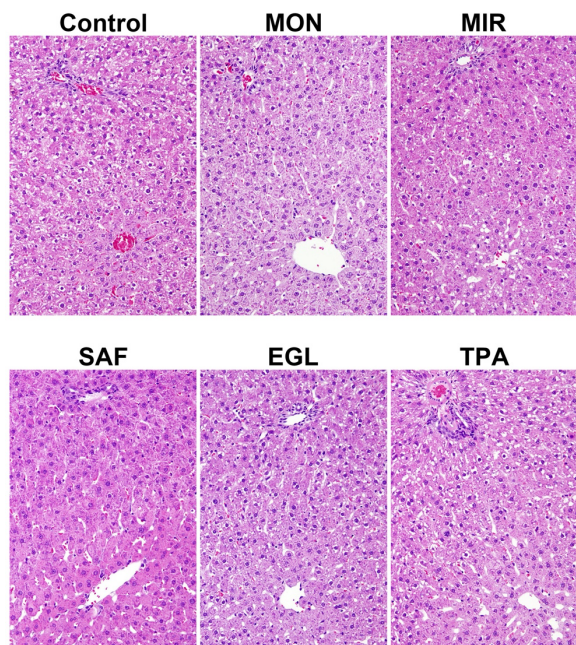


図1. 各物質を投与したラット肝臓組織像

各肝臓組織からRNAを抽出した結果、平均38.5 ± 17.0 μgのtotal RNAを回収し、質もA260/A280が平均2.11 ± 0.13と良い状態だった。マイクロアレイ解析を行った結果、対照群に対してZ scoreが2倍以上、発現差が1.5倍以上変動した遺伝子は、MON投与群においては上昇361、低下309、MIR投与群では上昇343、低下210、SAF投与群では上昇386、低下397、EGL投与群では上昇266、低下283、TPA投与群では上昇362、低下331の遺伝子を認めた。

各投与群における遺伝子発現データについて、構築済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、従来の予測モデルおよび14遺伝子モデルにおいては、SAFのみ陽性と判定され、他の2物質は陰性と判定された。また、非発がん物質はいずれも陰性と判定された。一方、高感受性モデルにおいては、SAFに加え、MIRにおいても陽性と判定されたが、非肝発がん物質EGLが陽性と判定された(表2)。

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		14遺伝子モデル		高感受性モデル	
			判定	成否	判定	成否	判定	成否
Monuron	MON	陽性	陰性	×	陰性	×	陰性	×
Mirex	MIR	陽性	陰性	×	陰性	×	陽性	○
Safrole	SAF	陽性	陽性	○	陰性	○	陽性	○
Ethylene glycol	EGL	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Terephthalic acid	TPA	陰性	陰性	○	陰性	○	陽性	×

D. 考察

今回、いずれの予測モデルにおいても発がん物質として同定できたSAFは、強い肝組織像の変化が存在し、対照群との遺伝子発現が変化した遺伝子数も多く認められた。一方、組織学的にも変化を認めたMIRは高感受性モデルでのみ陽性と判定された。MONは体重増加抑制を認める濃度での投与を行ったが、相対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。従来モデルや14遺伝子モデルでは、非肝発がん物質EGLおよびTPAが陰性と判定されたものの、高感受性モデルではEGLが陽性と判定された。感度の上昇とともに特異度の低下が見られ、モデル開発の難しさを示した。

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抽出した肝臓から得られたRNAを用いた遺伝子セットによる肝発がん性予測モデルは、非遺伝毒性肝発がん物質の検出法として有用であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Suzuki S, Oishi Y, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks. *J Toxicol Pathol.* 2023; 36: 123-9.
- 2) Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology.* 2023; 488: 153483.
- 3) Deguchi S, Tanaka H, Suzuki S, Natsuki S, Mori T, Miki Y, Yoshii M, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Clinical relevance of tertiary lymphoid structures in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2022; 22: 699.
- 4) Kondo N, Sakurai Y, Takata T, Kano K, Kume K, Maeda M, Takai N, Suzuki S, Eto F, Kikushima K, Wanibuchi H, Miyatake SI, Kajihara T, Oda S, Setou M, Aoki J, Suzuki M. Persistent elevation of lysophosphatidylcholine promotes radiation brain necrosis with microglial recruitment by P2RX4 activation. *Sci Rep.* 2022; 12: 8718.
- 5) Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, Suzuki S, Fujioka M, Kakehashi A, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. The carbonic

anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling. *Cancer Sci.* 2022; 113: 2642-53.

- 6) 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.
- 7) 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; 35: 247-54.

2. 学会発表

- 1) 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類の尿中代謝物と膀胱尿路上皮への影響. 第111回日本病理学会総会、神戸 (2022年4月)
- 2) 梯アンナ、鈴木周五、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける新規標的分子ターゲットとしてのCanopy homolog 2の役割. 第111回日本病理学会総会、神戸 (2022年4月)
- 3) 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o-toluidineの尿中代謝物と膀胱尿路上皮への影響. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
- 4) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 1,4-ジオキサンの肝発がん機序の解明と定量的発がんリスク評価. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
- 5) 小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析. 第29回日本がん予防学術大会、京都 (2022年7月)
- 6) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 7) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 8) 魏民、鈴木周五、山下聡、藤岡正喜、梯アンナ、山本与毅、邱桂ユウ、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81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 9) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、邱桂ユウ、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 10) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、

邱桂鈺、芝野佳奈、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物の発がん性およびその機序. 第35回発癌病理研究会、湯沢 (2022年11月)

- 11) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析. 第51回環境変異原学会、広島 (2022年11月)
- 12) 藤岡正喜、魏民、Vachiraarunwon Arpamas、鈴木周五、鰐淵英機. 無機ヒ素曝露ヒト肝マウスにおける尿中及び糞中ヒ素の化学形態別性状の解析. 第27回ヒ素シンポジウム、今治 (2022年12月)
- 13) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸による膀胱発がん機序の解明. 第27回ヒ素シンポジウム、今治 (2022年12月)
- 14) 魏民、藤岡正喜、鈴木周五、山本与毅、Vachiraarunwon Arpamas、梯アンナ、鰐淵英機. ヒ素誘発膀胱発がん過程におけるDNAメチル化異常の関与. 第27回ヒ素シンポジウム、今治 (2022年12月)
- 15) 山本与毅、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwon、Guiyu Qiu、芝野佳奈、清水一希、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱がんにおけるDNAメチル化異常. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 16) Arpamas Vachiraarunwon、Min Gi、Tohru Kiyono、Shugo Suzuki、Kana Shibano、Guiyu Qiu、Pharapirom Aroonrat、Anna Kakehashi、Masaki Fujioka、Hideki Wanibuchi. Toxicities of various arsenicals on immortalized normal human bladder epithelial cells. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 17) 梯アンナ、西土井悠作、Guiyu Qiu、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカー候補の解析. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 18) Guiyu Qiu、梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌におけるPRDX3の機能解明. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 19) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、芝野佳奈、Guiyu Qiu、Arpamas Vachiraarunwon、Pharapirom Aroonrat、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 20) 芝野佳奈、藤岡正喜、魏民、Arpamas Vachiraarunwon、Pharapirom Aroonrat、Guiyu Qiu、鈴木周五、鰐淵英機. ヒト化肝臓マウスにおける無機ヒ素の体内動態及び毒性. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 21) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めたo-toluidineの尿中代謝物による膀胱尿路上皮への影響. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023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4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4年度は、6週齢の雄SDラットに非遺伝毒性肝発がん物質であるFuranを0, 3, 10および30 mg/kg、ならびに非肝発がん物質であるEthyl acrylateを200 mg/kgの用量で28日間反復経口投与し、肝臓の病理組織学的検索および網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、Furanにより誘発される胆管線維症およびoval cell過形成等の特徴的な肝病変は、明確な用量相関性を示すことが明らかとなった。本研究の成果は、遺伝子セットを用いた肝発がん物質短期検出法の開発に向け、有効な基礎データになり得ると考えられた。

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2～4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4年度の被験物質として、肝臓を標的としない非遺伝毒性発がん物質のEthyl acrylate (EA)および非遺伝毒性肝発がん物質であるFuranを選定し、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（5匹/群）。このうちEAは、化審法における優先評価化学物質に指定されている。各物質の投与濃度は短期試験における最大耐量（EA：200 mg/kg、Furan：30 mg/kg）を用い、Furanについては病理組織学的所見および遺伝子発現動態の用量相関性を検討するため、中・低用量群として10および3 mg/kg群を併せて設定した。

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、凍結採材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 Clariom 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）

動物実験の実施にあたっては、使用する動物数は最小限にとどめ、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験委員会の承認を経て、同所が定める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。Furan（高用量）投与群において、統計学的有意差はないものの体重増加抑制の傾向が認められた。同群では、摂餌量の低値および飲水量の高値傾向もみられた。

各投与群における肝および腎重量を表2に示す。

Furan 投与群では用量依存性の肝重量増加が認められ、中および高用量群における肝相対重量の有意な増加に加え、高用量群では肝絶対重量の増加も観察された。また、Furan (高用量) 投与群では腎相対重量も有意に増加した。

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	188.8 ± 9.1	413.3 ± 28.3	21.0	35.3
Ethyl acrylate	188.6 ± 9.3	392.7 ± 22.3	20.2	39.0
Furan (low)	188.8 ± 6.2	384.9 ± 42.0	19.9	38.4
Furan (mid)	188.7 ± 14.4	406.6 ± 59.8	21.8	34.3
Furan (high)	188.3 ± 10.6	358.6 ± 41.3	18.9	47.0

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	16.5 ± 1.93	3.99 ± 0.24	2.80 ± 0.25	0.68 ± 0.04
Ethyl acrylate	15.3 ± 1.34	3.89 ± 0.17	2.57 ± 0.05	0.66 ± 0.04
Furan (low)	15.8 ± 3.10	4.08 ± 0.38	2.62 ± 0.48	0.68 ± 0.06
Furan (mid)	19.3 ± 3.64	4.71 ± 0.27*	2.77 ± 0.28	0.69 ± 0.05
Furan (high)	24.2 ± 2.22**	6.76 ± 0.53**	2.91 ± 0.40	0.81 ± 0.04**

*, **; P < 0.05 and 0.01 vs. Control (Dunnett).

肝臓の病理組織学的検索の結果、Furan (高用量) 投与群において、重度の胆管線維症 (図 1 下段左) および oval cell の過形成が特に尾状葉で顕著に認められたほか、肝細胞のびまん性肥大および核の大型化 (図 1 下段右) が観察された。Furan 投与群におけるこれらの肝病変の程度は、明確な用量相関性を示した (図 1 中段)。一方、対照群および EA 投与群では肝臓に明らかな病変は認められなかった (図 1 上段)。

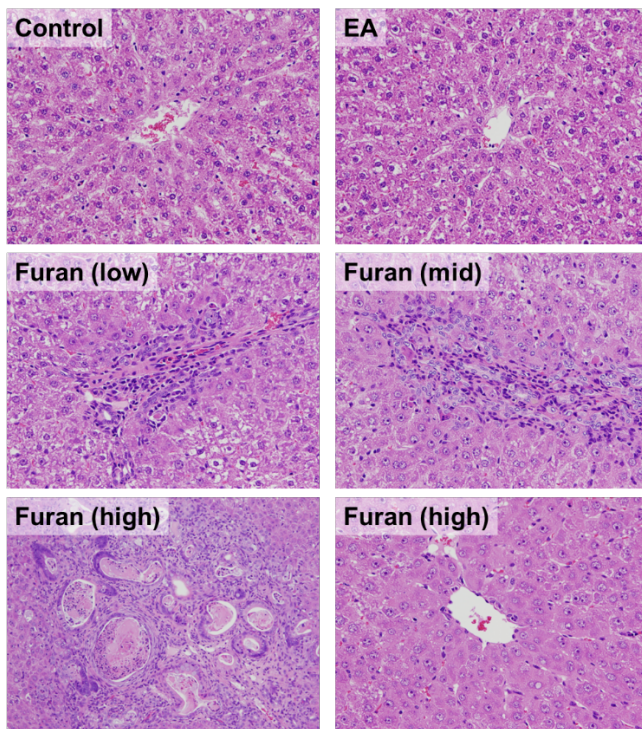


図 1. 各投与群の肝臓における病理組織学的変化

D. 考察

令和 4 年度は、肝臓を標的としない非遺伝毒性発がん物質 (EA) および非遺伝毒性肝発がん物質 (Furan)

各 1 物質について、短期試験での最大用量を用いたラット 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。

EA は樹脂・プラスチック等のポリマー原料として用いられ、優先評価化学物質に指定されている。長期の経口投与によって齧歯類の前胃に発がん性を示すことが知られ、国際がん研究機関 (IARC) による評価ではグループ 2B (「ヒトに対する発がん性が疑われる」) に分類されている (IARC, 2019)。一方で、肝臓に対する毒性影響は報告されておらず、本研究においても肝臓に明らかな病変は認められなかった。令和 2 年度に検討した Caprolactam (非発がん物質) と同様に、遺伝子発現動態に基づく非遺伝毒性肝発がん物質検出法の開発における陰性対照物質として有用であることが確認された。

Furan は化学物質の合成中間体として利用される一方、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。ラット肝臓において胆道系および肝細胞の腫瘍を高頻度に発生させ、IARC による評価ではグループ 2B に分類されている (IARC, 1995)。本研究において、Furan は肝臓に胆管線維症等の特徴的な病理組織学的所見を誘発し、その程度は明瞭な用量相関性を示すことが明らかとなった。

各群の肝臓から抽出した total RNA を用いた網羅的遺伝子発現解析を実施し、得られた結果を共同研究者に提出済みである。本研究の成果は、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、有効な基礎データになり得ると考えられた。

E. 結論

令和 4 年度は、肝臓を標的としない非遺伝毒性発がん物質 (EA) および非遺伝毒性肝発がん物質 (Furan) 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網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、EA は明らかな肝病変を誘導しない一方、Furan により誘発される肝病変の程度は明瞭な用量相関性を示すことが明らかとなった。遺伝子セットを用いた肝発がん性短期検出法の開発において、両物質はそれぞれ陰性対照および用量相関性の検証に有用であることが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toyoda T, Sone M, Matsushita K, Akane H, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Cho YM, Ogawa K. Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX. J Toxicol Sci. in press
- 2) Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. Food Chem Toxicol. 2023; 175: 113702.
- 3) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Cho YM, Ogawa K. Persistent γ -H2AX formation and expression of stem cell markers in N-butyl-N-(4-

- hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Toxicol Sci.* 2022; 189: 51-61.
- 4) Toyoda T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX: a review from analyses of 100 chemicals. *J Toxicol Pathol.* 2022; 35: 283-98.
 - 5) Toyoda T, Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from o-toluidine and o-anisidine after 28-day oral administration to rats. *J Toxicol Sci.* 2022; 47: 457-66.
 - 6) Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic homo- and hetero-dimers of o-toluidine, o-anisidine, and aniline formed by in vitro metabolism. *Chem Res Toxicol.* 2022; 35: 1625-30.
 - 7) Arakawa N, Ushiki A, Abe M, Matsuyama S, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Miyashita K, Saito K, Nakamura R, Toyoda T, Ogawa K, Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiya T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M. Stratifin as a novel diagnostic biomarker in serum for diffuse alveolar damage. *Nat Commun.* 2022; 13: 5854.
- ## 2. 学会発表
- 1) Toyoda T, Yamada T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023年3月)
 - 2) 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AX 免疫染色を指標とした腎発がん性の短期評価法開発. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京 (2023年1月)
 - 3) 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子. 化学物質誘発ラット膀胱腫瘍の発生過程における γ -H2AXの役割. 第81回日本癌学会学術総会, 横浜 (2022年9月)
 - 4) 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AXを指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発. 第49回日本毒性学会学術年会, 札幌 (2022年7月)
 - 5) 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. 結晶子径6 nmの超微小粒子径アナターゼ型二酸化チタンナノ粒子の反復経口投与毒性. 日本薬学会第143年会, 札幌 (2023年3月)
 - 6) Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Akane H, Toyoda T. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023年3月)
 - 7) Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Comparison of sensitivity between histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors and promoters of thyroid hormone metabolism. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023年3月)
 - 8) 小林琢磨, 豊田武士, 吉岡泰淳, 渡邊正悟, 岸本真治, 松下幸平, 赤根弘敏, 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新規尿中代謝物はラット膀胱上皮におけるALDH1A1の発現を誘導する. 日本農芸化学会2023年度大会, Web開催 (2023年3月)
 - 9) 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. ヨウ素取込み阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出指標としての病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値の比較. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京 (2023年1月)
 - 10) 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. 腎線維化における部分的上皮間葉転換の生じた尿細管の役割とCD44との関連. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京 (2023年1月)
 - 11) 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病変におけるCD44陽性尿細管の病態生理学的意義. 第5回医薬品毒性機序研究会, 東京 (2022年12月)
 - 12) 岡本悠佑, 福井千恵, 赤根弘敏, 豊田武士, 梶山健次, 権英淑, 神山文男, 小川久美子, 伊豆津健一, 山本栄一, 野村祐介. コーティング型マイクロニードルアレイにおける高極性薬剤の皮膚透過性の評価. 第44回日本バイオマテリアル学会, 東京 (2022年11月)
 - 13) 増田寛喜, 豊田武士, 宮下知治, 吉田寛, 瀬戸泰之, 野村幸世. ラット外科的逆流モデルにおけるバレット食道に対するMEKインヒビターの治療効果の検討. 第33回日本消化器癌発生病学会総会, 東京 (2022年11月)
 - 14) 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. ナノサイズ二酸化チタンの90日間反復経口投与毒性. 第59回全国衛生化学技術協議会年会, 川崎 (2022年11月)
 - 15) 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的手法による抗甲状腺物質の検出. 第81回日本癌学会学術総会, 横浜 (2022年9月)
 - 16) 赤木純一, 豊田武士, 小川久美子. γ -H2AXとの組み合わせによる肝発癌物質検出のためのバイオマーカーとしてのEpCAMおよびアミノペプチダーゼ

N の有用性. 第 81 回日本癌学会学術総会、横浜 (2022 年 9 月)

- 17) 増田寛喜、豊田武士、宮下知治、吉田寛、瀬戸泰之、野村幸世. ラット外科的逆流モデルにおけるバレット食道に対する MEK インヒビターの治療効果の検討. 第 81 回日本癌学会学術総会、横浜 (2022 年 9 月)
- 18) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 薬剤性腎障害から慢性腎臓病への移行を予測するバイオマーカーの探索. 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京 (2022 年 8 月)
- 19) 岡本悠佑、福井千恵、赤根弘敏、豊田武士、梶山健次、権英淑、神山文男、小川久美子、伊豆津健一、山本栄一、野村祐介. コーティング型マイクロニードルアレイにおける穿刺性及び薬剤透過性の評価. 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京 (2022 年 8 月)
- 20) Kobayashi T, Toyoda T, Yoshioka Y, Murai N, Kishimoto S, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic metabolites of *o*-toluidine and *o*-anisidine induce ALDH1A1 in rat bladder epithelium. 13th International Conference on Environmental Mutagens, Ottawa (2022 年 8 月)
- 21) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ナノサイズ酸化チタン (IV) の毒性研究. 第 49 回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022 年 7 月)
- 22) 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. 甲状腺ホル

モン代謝促進物質投与ラットにおける抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較. 第 49 回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022 年 7 月)

- 23) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. アロプリノール誘発腎線維化モデルラットを用いた CD44 の腎線維化バイオマーカーとしての有用性の検証. 第 49 回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022 年 7 月)
- 24) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、赤根弘敏、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. 細胞毒性を有する *o*-Toluidine と *o*-anisidine の尿中代謝物はラット膀胱上皮で ALDH1A1 を誘導する. 第 29 回日本がん予防学会総会、京都 (2022 年 7 月)
- 25) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. AKI から CKD への移行における CD44 の役割とバイオマーカーとしての応用. 第 65 回日本腎臓学会学術総会、神戸 (2022 年 6 月)
- 26) 森川朋美、豊田武士、赤根弘敏、松下幸平、小川久美子. ラットを用いたオリゴガラクトン酸の 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 28 回総会・学術大会、東京 (2022 年 5 月)

G. 知的所有権の取得状況

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

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、非肝発がん物質3種：Nitrilotriacetic acid (0.1%)、Acrylic acid (0.5%)、Triethanolamine (2%) を飲水投与し、肝臓における遺伝子の発現変化を網羅的に調べた。その結果、Nitrilotriacetic acid、Acrylic acid、Triethanolamineのいずれも陰性と判定された。

A. 研究目的

生活環境を取り巻く化学物質の発がん性を迅速にかつ高精度に検証できるシステムの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、システムで得られた結果は国民生活の安全・安心を保証する。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の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、非肝発がん物質3種：Nitrilotriacetic acid (0.1% in water)、Acrylic acid (0.5% in water)、Triethanolamine (2% in water) を飲水投与した。

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の大きさに2スライス切り出した。それぞれ1mLのRNAlaterが入った1.5mLチューブへ移した（合計2本、そのうち1本は、他施設でのバリデーション用）。1.5mLチューブを4℃で一晩保管後、-80℃へ長期保管した。凍結保存サンプル用として、RNA抽出用に採材した後の残りの外側左葉の上半分を1.5mLチューブ2本分採取し、液体窒素により凍結後、ディープフリーザーにて凍結保管した（一本はDNA adduct解析用）。ホルマリン固定用サンプルは、外側左葉の下半分、内側右葉（RM）および右葉尾部（R2）から計3スライス切り出し、カセットにおいて10%ホルマリンにて固定した。

肝臓からのtotal RNA抽出はRNeasy mini kit (キアゲン) を使用し、3mm×3mm程度の肝組織片からtotal RNAを抽出した。1群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。肝臓のtotal RNA抽出から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

Nitritotriacetic acid群 (Group 1) やAcrylic acid群 (Group 2) において有意な飲水量 (図1) および摂餌量 (図2) の低下が見られる週があったが、いずれの群間においても有意な体重変化は認められなかった (図3)。

剖検時の体重および肝重量を表1に示す。いずれの群についても、体重および肝重量 (絶対および相対) の有意な変化は見られなかった。

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

アレイ解析の結果を肝発がん性予測モデルに入力したところ、今回検討した3物質のいずれも「negative」という結果であった。

D. 考察

今回の4群 (被験物質3群) については、週によっては摂餌量や飲水量の低下が見られたものの、体重の群間差は認められなかった。いずれの群においても、肝臓の重量および組織学的な変化は見られなかった。

肝発がん性予測モデルにより、今回検討した3物質のいずれも「negative」の結果であったことから、本モデルの有用性が期待された。

E. 結論

今回、肝発がん性予測モデルにより、今回検討した3物質のいずれも結果は「negative」であり、予想通りとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishino T, Abe T, Kaneko M, Yokohira M, Yamakawa K, Imaida K, Konishi H. GAREM1 is involved in controlling body mass in mice and humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022; 628: 91-97.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

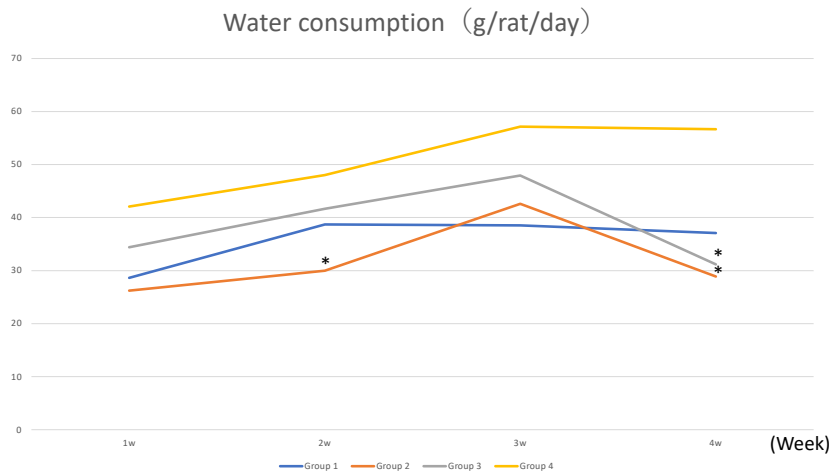
3. その他

なし

表 1. 剖検時体重および肝重量

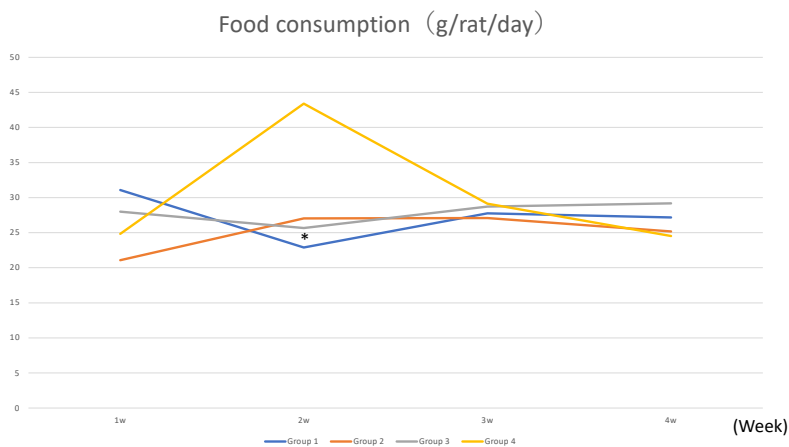
Groups	Treatment	No.	Body weights (g)	Liver weights	
				Absolute (g)	Relative (%)
1	Nitilotriacetic acid	5	388.0 ± 18.5	16.5 ± 2.2	4.2 ± 0.4
2	Acrylic acid	5	404.8 ± 20.5	17.6 ± 2.0	4.3 ± 0.3
3	Triethanolamine	5	393.1 ± 21.7	16.7 ± 0.9	4.2 ± 0.2
4	Control	5	395.3 ± 20.8	16.9 ± 2.2	4.3 ± 0.4

No inter-group difference.



* P<0.05 vs control group

図 1. 飲水量の経時的変化



* P<0.05 vs control group

図 2. 摂餌量の経時的変化

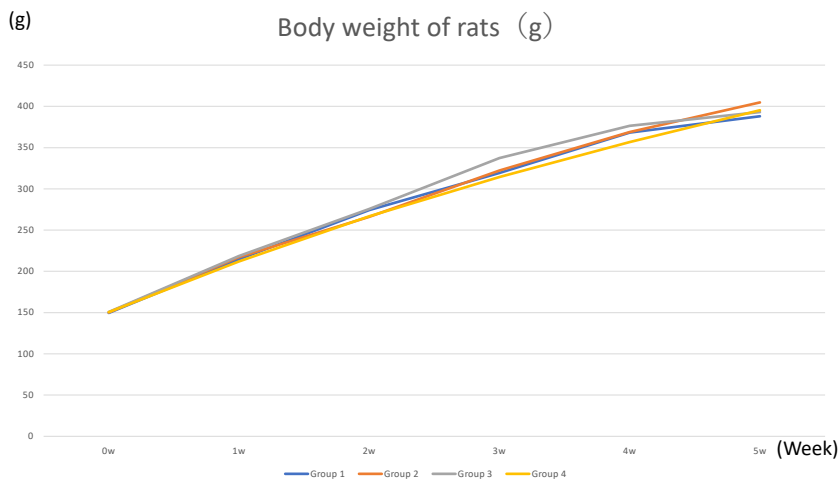


図 3. 体重の経時的変化

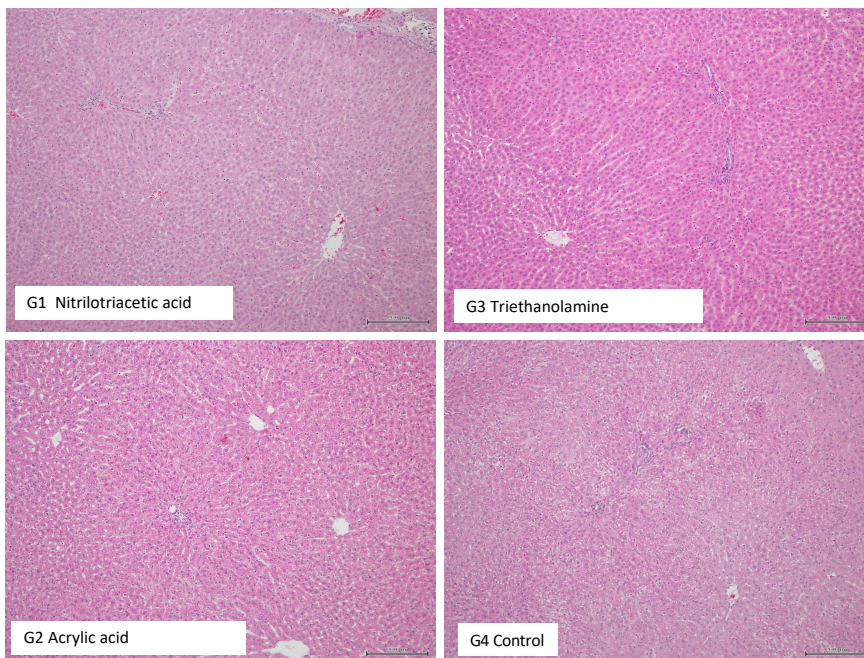


図 4. 各群のラット肝臓の病理組織像

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和4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
(20KD1002)

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。令和4年度は、新規優先評価化学物質としてDimethyl Terephthalate (DMT)とともに、令和3年度に研究分担者の横平が検討し、いずれの遺伝子セットにおいても発がん性予測の陽性を示したBis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) (5.0%摂餌投与)について、低濃度での検出力を検討するために、5.0%に加えて1.5%、0.5%を設定し、28日間混餌投与を行った。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、高感受性モデルによる肝発がん性予測を行った。実験の結果、DEHPは全ての濃度、全ての検出法で陽性を示し、低濃度から検出できることが示唆され、遺伝子セットの発現量はDEHPの濃度依存性に上昇していた。DMTは長期投与試験で発がん性なしとされ、従来法では陰性を示したが、14遺伝子セットや高感受性モデルでは陽性を示した。以上の結果から、遺伝子セットによる肝発がん性予測モデルは、DEHPに関しては低濃度から検出可能である有用なモデルである。DMTに関しては、本実験は3%と高い濃度で投与行っており、高用量における発がん性については慎重に検討する必要があると考えられる。

A. 研究目的

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

本研究では化学物質の標的となる臓器の大半は肝臓であることに着目し、肝発がん性を短期で高精度に検証できるシステムの確立を目指す。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により定量化することで、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。さらに昨年度までに、新規に構築した14遺伝子モデル、高感受性モデルの遺伝子セットでの評価を行い、感度、特異度の高い非肝発がん性予測遺伝子セットの構築と検証を行う。

B. 研究方法

OECD テストガイドライン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。被験物質として、令和3年度に研究分担者の横平

が検討し、いずれの遺伝子セットにおいても発がん性予測の陽性を示したBis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) (5.0%摂餌投与)について、低濃度での検出力を検討するために、5.0%に加えて1.5%、0.5%を設定した。さらに、新たな優先評価化学物質としてDimethyl Terephthalate (DMT) (3%摂餌投与)を検討した。

いずれも6週齢SD雄ラットを各群6匹に分け、28日間混餌投与と実験を行い、肝臓を採取した。その後、HE染色による組織学的検討、Ki-67、GST-P免疫染色による解析を実施した。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、RNA laterで凍結保存した肝外側左葉の一部からmRNAを抽出し、Clariom D Assayのマイクロアレイ解析を行った。その結果を用い、以前に構築した106遺伝子モデル、再構築した14遺伝子モデル、また昨年度新たに感度を上げて設定した高感受性モデルにおける肝発がん性予測を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は名古屋市立大学動物実験委員会及び名古屋市立大学理事長の承認を得て行った(承認番号:医動22-010)。実施は動物実験指針や3Rの原則を遵守して、動物愛護や苦痛の緩和に十分留意して実験を行った。

C. 研究結果

実験期間中DHEP 5.0%群で著明な体重減少が見られ、実験23日目に1匹死亡を確認した。一方で、DHEP 0.5%、1.5%群は一時的に体重減少が見られたが、屠殺時にControl群と有意な差は見られなかった(図1)。屠殺時の臓器重量は、DEHP群のいずれの濃度においても相対

肝重量の有意な増加を認め(P<0.001)、DHEP 1.5%、5.0%群は相対腎重量の有意な増加も見られた(P<0.001)。DMT群では体重、臓器重量ともに有意な変化は認めなかった(表1)。

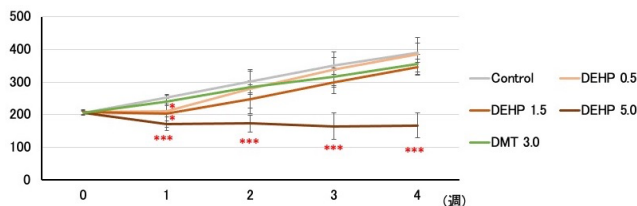


図1. 体重変化(g)

表1. 体重及び臓器重量

n	体重 (g)	肝		腎(左右)		脾	
		重量 (g)	相対 (%)	重量 (g)	相対 (%)	重量 (g)	相対 (%)
Control	391±29	14.53±2.21	3.71±0.38	2.51±0.25	0.64±0.05	0.72±0.08	0.18±0.01
DEHP 0.5	385±53	20.09±2.26***	5.25±0.46***	2.69±0.23	0.70±0.05	0.77±0.15	0.20±0.03
DEHP 1.5	346±24	21.99±1.85***	6.36±0.35***	2.83±0.19	0.82±0.04***	0.81±0.15	0.23±0.04
DEHP 5.0	168±37***	12.41±3.49	7.30±0.61***	1.64±0.35	0.98±0.07***	0.37±0.09***	0.22±0.01
DMT 3.0	355±30	15.01±1.13	4.25±0.40	2.35±0.24	0.66±0.03	0.62±0.10	0.18±0.03

体重と摂餌量の結果からDEHP 0.5%、1.5%、5.0%群とDMT 3.0%群の被検物質投与量はそれぞれ358、1,017、3,575 mg/kg/dayと2,428mg/kg/day相当と換算された。

病理組織学的検討では、DEHP群のいずれの濃度においても、細胞質の好酸性変化とともに肝細胞腫大を全例に認めたが、0.5%群ではその程度は弱かった。DMT群では明らかな組織学的な変化はみられなかった(図2)。Ki67陽性率はDHEP群の全群で有意な低下が見られた(図3)。GST-P陽性細胞はいずれの群でも観察されなかった。

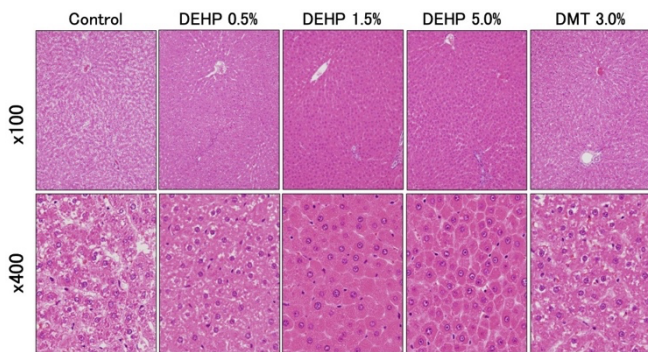


図2. 肝臓のHE所見

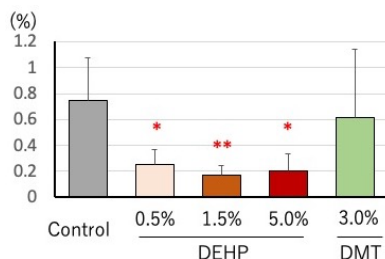


図3. 肝外側左葉Ki-67陽性細胞率

マイクロアレイデータを用いた肝発がん性予測の結果、DEHP 0.5%、1.5%、5.0%群は従来の106遺伝子セッ

ト、14遺伝子セット、高感受性セットのいずれにおいても肝発がん性予測判定陽性を示した。DMT群では従来の106遺伝子セットでは陰性判定であったが、14遺伝子セットや高感受性セットにおいては陽性判定となった(表2)。

表2. 肝発がん性予測の結果

	肝発がん性	106遺伝子モデル	成否	14遺伝子モデル	成否	高感受性モデル	成否
DEHP 0.5%	非遺伝性肝発がん物質	陽性	○	陽性	○	陽性	○
DEHP 1.5%	非遺伝性肝発がん物質	陽性	○	陽性	○	陽性	○
DEHP 5.0%	非遺伝性肝発がん物質	陽性	○	陽性	○	陽性	○
DMT 3.0%	優先評価化学物質	陰性	○	陽性	×	陽性	×

D. 考察

DEHP 5.0%投与群においては令和3年度に行った横平の実験結果と同様にいずれの遺伝子セットでも肝発がん性予測は陽性判定となり、再現性が確認された。5.0%は体重抑制が強く見られる濃度であったが、0.5%、1.5%の低濃度においても各遺伝子セットで肝発がん性予測は陽性となり、遺伝子発現変化による本検出系は低濃度でも検出可能であり、高感度のモデルと考えられる。Fischer 344ラットを用いた103週の長期混餌投与実験では、6,000 ppm以上の濃度で腫瘍発生増加を認めている。本実験においては、0.5% (5000 ppm)がその濃度に近似し、長期発がん性試験の濃度でも、28日間投与でその肝発がん性予測が可能であることが示された。遺伝子発現に関して詳細に見ていくと、その発現量がControl群 < DEHP0.5%群 < DEHP1.5%群 < DEHP5.0%群と濃度依存性に上昇していく遺伝子が、14遺伝子モデルにおいては58.3%、高感受性モデルでは60%みられた。それぞれの遺伝子発現量に対して順位付け(1~4)を行って、DHEP濃度との相関性をみると、14遺伝子モデルでSpearman $r = 0.7664$ (P < 0.001)、高感受性モデルでSpearman $r = 0.6668$ (P < 0.001)と強い相関が観察され、濃度依存性の遺伝子発現変化がみられた。

DMTは優先評価化学物質であるが、Fischer 344ラットでは0.175%~2%の13週混餌投与によって、肝細胞腫脹が見られている。しかし、Fischer 344ラットにおける103週間混餌投与(最大0.5%)の長期試験において、有意な腫瘍発生は見られず、発がん性はないとされる。今回106遺伝子セットでは陰性判定であったが、14遺伝子モデル、高感受性モデルにおいては陽性を示した。本実験では3%と高い濃度で投与行っており、高用量における発がん性については慎重に検討する必要があると考えられる。

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、非遺伝毒性肝発がん物質を低濃度から検出できる可能性が示唆された。優先評価物質であるDMTはモデルによって評価が変動するため、高用量における発がん性については慎重に検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chlopek M, Lasota J, Thompson LDR, Szczepaniak M, Kuzniacka A, Hincza K, Kubicka K, Kaczorowski M, Newford M, Liu Y, Agaimy A, Biernat W, Durzynska M, Dziuba I, Hartmann A, Inaguma S, Izycka-Swieszewska E, Kato H, Kopczyński J, Michal M, Michal M, Peksa R, Prochorec-Sobieszek M, Starzynska A, Takahashi S, Wasag B, Kowalik A, Miettinen M. Alterations in key signaling pathways in sinonasal tract melanoma. A molecular genetics and immunohistochemical study of 90 cases and comprehensive review of the literature. *Mod Pathol.* 2022; 35: 1609-17.
- 2) Hisada T, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Osaga S, Fujita T, Asano T, Uemoto Y, Nishikawa S, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Sugiura H, Okuda K, Kato H, Komura M, Morita S, Takahashi S, Toyama T. Co-expression effect of LLGL2 and SLC7A5 to predict prognosis in ERalpha-positive breast cancer. *Sci Rep.* 2022; 12: 16515.
- 3) Kato A, Kato H, Naitoh I, Hayashi K, Yoshida M, Hori Y, Kachi K, Asano G, Sahashi H, Toyohara T, Kuno K, Kito Y, Takahashi S, Kataoka H. Use of Endoscopic Scraper and Cell Block Technique as a Replacement for Conventional Brush for Diagnosing Malignant Biliary Strictures. *Cancers (Basel).* 2022; 14.
- 4) Kato A, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Hisada T, Uemoto Y, Terada M, Kato H, Komura M, Okuda K, Takahashi S, Toyama T. Low TINAGL1 expression is a marker for poor prognosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2022.
- 5) Kato A, Naitoh I, Naiki-Ito A, Hayashi K, Okumura F, Fujita Y, Sano H, Nishi Y, Miyabe K, Inoue T, Hirano A, Takada H, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Kato H, Takahashi S, Kataoka H. Class III beta-Tubulin Expression

Is of Value in Selecting nab -Paclitaxel and Gemcitabine as First-Line Therapy in Unresectable Pancreatic Cancer. *Pancreas.* 2022; 51: 372-9.

- 6) Uemoto Y, Katsuta E, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Hisada T, Terada M, Kato A, Okuda K, Sugiura H, Komura M, Kato H, Osaga S, Takahashi S, Toyama T. Low HECTD1 mRNA expression is associated with poor prognosis and may be correlated with increased mitochondrial respiratory function in breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2022; 12: 1593-605.

2. 学会発表

- 1) 加藤寛之、小村理行、内木綾、稲熊真悟、高橋智. 全身性ヘモクロマトーシスを伴う有口赤血球症の1剖検例. 第111回日本病理学会総会、神戸(2022年4月)
- 2) 加藤寛之、内木綾、小村理行、稲熊真悟、高橋智. DPYD and STAT3 pathways are inhibited by luteolin and show interdependent expression in pancreatic cancer. The 7th JCA-AACR Special Joint Conference、京都(2022年7月)
- 3) 加藤寛之、内木綾、稲熊真悟、小村理行、高橋智. The role of dipyrimidine dehydrogenase in pancreatic cancer. 第80回日本癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 4) 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智. 膵癌におけるLuteolinのDPYD抑制効果の意義と5-FU併用投与による効果の検討. 第39回日本同区性病理解学会及び学術総会、東京(2023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 大阪公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った。本年度は、これまでのモデルを用いた検討において偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質の5種類について新たな肝発がん検出モデルを作成し検討した。その結果、新モデル作成に用いた2物質及び2つの陽性と判定された物質の合計4物質が陽性判定とされるモデル構築が出来た。我々の開発した2つのモデルを組み合わせることで、遺伝毒性肝発がん物質を感度97%及び特異度95%と、高い精度で検出可能である。

A. 研究目的

化審法の規制区分「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」には、スクリーニング毒性試験の結果から健康影響の懸念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4年度は、これまでのモデル(モデル-1)を用いた検討において、偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質の5種類について、新たな肝発がん検出モデル(モデル-2)を作成し検討した。

B. 研究方法

新たな遺伝毒性肝発がん物質検出モデル-2作成に用いた物質を表1に記す。これまでに行った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で採取した肝組織からRNeasy mini kit(キアゲン)を用いてtotal RNAを抽出・精製し、GeneChip Clarion D Assay(Rat)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、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1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone(ADBAQ)において対照群と2倍以上発現差がある共通遺伝子であるとともに、陰性対照であるcarbon tetrachloride(CCL4)で発現変動が異なる遺伝子を選出した。選出遺伝子の発現変動を基に、OPDおよびADBAQを陽性、CCL4および平成30年度および令和3年度の対照群を陰性とする教師セットを用いて、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新たな遺伝毒性肝発がん物質の検出モデル-2を作成した。

表1. 新たな遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた検討結果

被験物質	分類	TD50 (mg/kg)	LD50 (mg/kg)	投与量 (mg/kg)	判定結果 (新モデル)	正否
2-Nitropropane (2-NP)	遺伝毒性 肝発がん物質	不明	不明	240	陰性	不正解
Vinyl bromide (VB)	遺伝毒性 肝発がん物質	18.5	500	170	陽性	正解
CCL4	非遺伝毒性 肝発がん物質	27.8	2350	780	陰性	正解
Disperse Blue 134 (DB-134)	遺伝毒性 「発がん性不明」	不明	不明	2000*	陰性	不明
o-phenylenediamine (OPD)	遺伝毒性 肝発がん物質	不明	510	510	陽性	正解
Saflrole	遺伝毒性 肝発がん物質	441	1950	1950	陽性	正解
1-Amino-2,4- dibromoanthraquinone (ADBAQ)	遺伝毒性 肝発がん物質	46	不明	2000*	陽性	正解
4,4'-Diaminodiphenyl ether (ODA)	遺伝毒性 肝発がん物質	9.51	725	480	陰性	不正解

*OECD TG420 急性経口毒性試験において定められる最高用量

新たに作成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、2-Nitropropane (2NP)、Vinyl

bromide (VB)、*o*-phenylenediamine (OPD)、4,4'-Diaminodiphenyl ether (ODA)、Disperse Blue 134 (DB-134)及びSafroleの遺伝子発現結果を入力し、判定を行った。

(倫理面への配慮)

大阪公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

網羅的遺伝子発現解析で取得した遺伝子発現データを新規の遺伝毒性肝発がん物質検出モデル-2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、VB及びSafroleが陽性と判定された。教師セットとして用いたOPD及びDBAQに合わせて、5つの遺伝毒性発がん物質のうち4つが陽性(OPD,ADBAQ,VB及びSafrole)となる新しい遺伝子セットによるモデルが確立できた(表1)。一方、2NP、ODA、及びDB-134は陰性と判定された。

D. 考察

今回新たに作成したモデル-2において、5つの遺伝毒性発がん物質のうち4つが陽性となったことから、これまでに偽陰性となった遺伝毒性発がん物質には共通した発がん機序が存在する可能性が見られた。加えて、今までのモデルで陽性対照群として用いてきた2NPが陰性となったことから既存のモデル-1とは異なる発がん機序である可能性を示した。

また、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、我々の開発した2つの検出モデルを組み合わせて用いることで、遺伝毒性肝発がん物質を感度97%及び特異度95%と、高い精度で検出可能である。

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および新規モデルを複合して用いることで、遺伝毒性肝発がん物質を極めて高い精度で検出できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Suzuki S, Oishi Y, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks. *J Toxicol Pathol.* 2023; 36: 123-9.
- 2) Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda

N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. *o*-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology.* 2023; 488: 153483.

- 3) Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, Suzuki S, Fujioka M, Kakehashi A, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling. *Cancer Sci.* 2022; 113: 2642-53.
- 4) Oikawa D, Gi M, Kosako H, Shimizu K, Takahashi H, Shiota M, Hosomi S, Komakura K, Wanibuchi H, Tsuruta D, Sawasaki T, Tokunaga F. OTUD1 deubiquitinase regulates NF-kappaB- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways. *Cell Death Dis.* 2022; 13: 694.
- 5) 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; 35: 247-54.

2. 学会発表

- 1) 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類の尿中代謝物と膀胱尿路上皮への影響. 第111回日本病理学会総会、神戸(2022年4月)
- 2) 梯アンナ、鈴木周五、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける新規標的分子ターゲットとしてのCanopy homolog 2の役割. 第111回日本病理学会総会、神戸(2022年4月)
- 3) 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*o*-toluidineの尿中代謝物と膀胱尿路上皮への影響. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌(2022年7月)
- 4) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 1,4-ジオキサンの肝発がん機序の解明と定量的発がんリスク評価. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌(2022年7月)
- 5) 小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析. 第29回日本がん予防学術大会、京都(2022年7月)
- 6) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん. 第81回日本癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 7) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析. 第81回日本癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 8) 魏民、鈴木周五、山下聡、藤岡正喜、梯アンナ、山本与毅、邱桂ユウ、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81回日本癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 9) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、邱桂ユウ、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネ

- ティック修飾異常を介した肝発がんの亢進. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 10) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、邱桂鈺、芝野佳奈、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物の発がん性およびその機序. 第35回発癌病理研究会、湯沢 (2022年11月)
 - 11) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析. 第51回環境変異原学会、広島 (2022年11月)
 - 12) 藤岡正喜、魏民、Vachiraarunwon Arpamas、鈴木周五、鰐淵英機. 無機ヒ素曝露ヒト肝マウスにおける尿中及び糞中ヒ素の化学形態別性状の解析. 第27回ヒ素シンポジウム、今治 (2022年12月)
 - 13) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸による膀胱発がん機序の解明. 第27回ヒ素シンポジウム、今治 (2022年12月)
 - 14) 魏民、藤岡正喜、鈴木周五、山本与毅、Vachiraarunwong Arpamas、梯アンナ、鰐淵英機. ヒ素誘発膀胱発がん過程におけるDNAメチル化異常の関与. 第27回ヒ素シンポジウム、今治 (2022年12月)
 - 15) 山本与毅、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、Guiyu Qiu、芝野佳奈、清水一希、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱がんにおけるDNAメチル化異常. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
 - 16) Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Tohru Kiyono, Shugo Suzuki, Kana Shibano, Guiyu Qiu, Pharapirom Aroonrat, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Toxicities of various arsenicals on immortalized normal human bladder epithelial cells. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
 - 17) 梯アンナ、西土井悠作、Guiyu Qiu、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膀胱癌の新規バイオマーカー候補の解析. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
 - 18) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、芝野佳奈、Guiyu Qiu、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
 - 19) 芝野佳奈、藤岡正喜、魏民、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、Guiyu Qiu、鈴木周五、鰐淵英機. ヒト化肝臓マウスにおける無機ヒ素の体内動態及び毒性. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
 - 20) 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o-toluidineの尿中代謝物による膀胱尿路上皮への影響. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023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

研究代表者 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。さらに、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、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、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。また、今年度はさらに、2018 年データセットと 2019 年データセットを統合し、全てのサンプルに含まれる 5-methyl-dC のピークを内部標準としてデータの標準化を行なったうえで PCA-DA 解析を行なった。その結果、一部の「++」と「--」の分離はできなかったが、「+-」と「-+」とそれ以外はそれぞれにクラスタリングされた。さらに、毒性予測モデルの更なる正答率向上に向け、毒性予測モデルの実用性の観点から、標準化したデータを用い、遺伝毒性のみの毒性予測ラベル(遺伝毒性「+」or「-」)と発がん性のみの毒性予測ラベル(発がん性「+」or「-」)を作成し、毒性予測モデルの検討を実施した。遺伝毒性のみの毒性(遺伝毒性「+」or「-」)と発がん性のみの毒性(発がん性「+」or「-」)に分けた PCA-DA 解析の結果、遺伝毒性ではデータが分離されなかったが、発がん性では「+」と「-」で分離される傾向にあることがわかった。今後、このデータを用いて毒性予測モデルの検討を行うとともに、より適当な内部標準の検索を行い、標準化により正答率の向上に向けて検討していく予定である。

A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験(変異原性試験)、コメットアッセイ(DNA 損傷試験)、小核試験(染色体異常試験)などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは化学物質の発がん性の予測や有害性発現経路(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、複数の化学物質の

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更なる精度向上について検討した。

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；2 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表 1 に示す。これらのうち、今年度は非遺伝毒性肝発がん物質 4 種（EE, MCT, PB, CCL4）、遺伝毒性肝発がん物質 4 種（4,4-ODA, NEMA, ETU, MDA）、遺伝毒性非肝発がん物質 2 種（CPA, DNT）、非遺伝毒性非肝発がん物質 4 種（AA, TEO, CHL, PhB）について、再度 HRAM-アダクトーム解析を行なったデータを用いて検討を行った。

表 1. 使用した化学物質

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

抽出した DNA を、DNaseI、スクレアーズ P1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオチドに消化した後、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。得られたデータを主成分判別分析 (PCA-DA) により解析した。

(倫理面の配慮)

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

C. 研究結果

① Leave-One-Out 交差検証による正答率の評価

昨年までの結果から、PCA-DAのクラスタリング傾向と

毒性予測モデルの正答率の乖離があることがわかった。そこで原因を究明するために、ランダムフォレストの過学習があるのではないかと予測し、これを検証するため自由度の低い学習アルゴリズムを用いて物質毎・サンプル毎のLOOCVの検討を実施した。

まず物質毎のLOOCVの検討を行った結果、全66サンプルのうち23サンプルについて正答した（平均的な正答率35%）。毒性別の平均的な正答率は、「--」は90%、「-+」10%、「+-」0%、「++」18%であった。また、PCA-DAの「-+」と「++」は一部のクラスターが重なっており、毒性予測モデルでも「-+」の物質をLOOCVでテストしたとき「++」に誤答する傾向があり、同様に「++」の物質をLOOCVでテストしたとき「-+」に誤答する傾向が見られた（図1、表2）。

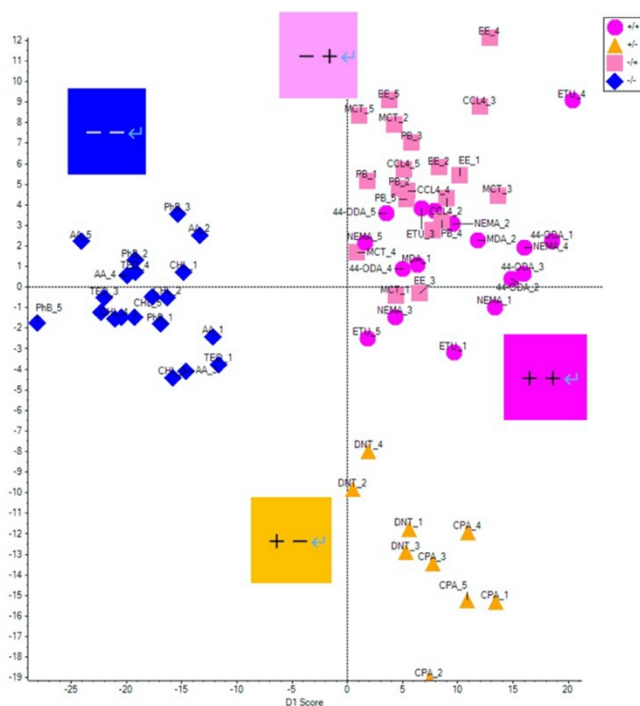


図1. 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価 (PCA-DAによる)

表2. 物質毎の正答率

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	1	5	0.2	3	0	1	1
EE	++	2019	0	5	0	5	0	0	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	3	0	1	0
44-ODA	+-	2019	1	5	0.2	1	0	3	1
ETU	+-	2019	0	5	0	0	0	4	1
MDA	+-	2018	1	2	0.5	1	0	1	0
NEMA	+-	2018	1	5	0.2	1	0	4	0
合計			23	66	0.35				

次にサンプル毎のLOOCVの検討を行った結果、全66サンプルのうち31サンプルについて正答した（平均的な正答率47%）。毒性別の平均的な正答率は、「--」は90%（物質毎のLOOCVと変化なし）、「-+」は45%（物質毎のLOOCVよりも35ポイント増加）、「+-」は0%（物質毎のLOOCVと変化なし）、「++」は24%（物質毎のLOOCV

よりも6ポイント増加)であった。また、PCA-DA (図2)でクラスターの一部が重なった「-+」と「++」について、物質毎のLOOCVよりも「-+」は正答率が向上(10%→45%)、同様に「++」も正答率が向上(18%→24%)した(表3)。なお、すべて誤答した「+-」は正答率の変化は確認できなかった。

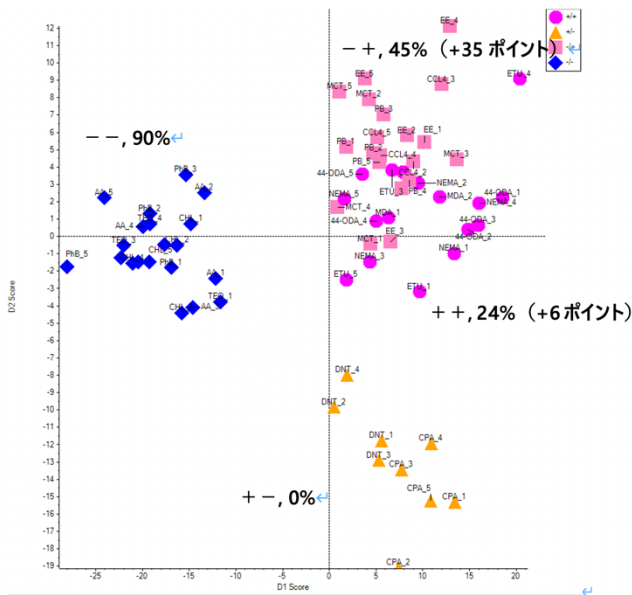


図2. サンプル毎の分類クラス別正答率。括弧内の数値は物質毎の正答率からの変化

表3. サンプル毎の正答率

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				

② 毒性予測ラベルの変更による予測精度向上の検討

毒性予測モデルの正答率向上に向けて、毒性予測モデルの実用性の観点から遺伝毒性のみの毒性予測ラベル(遺伝毒性「+」or「-」)と発がん性のみの毒性予測ラベル(発がん性「+」or「-」)を作成し、毒性予測モデルの検討を実施した。

・遺伝毒性のみを用いた毒性予測モデル

2018年度測定データ、2019年度測定データ、2021年度測定データについて、毒性予測ラベルに遺伝毒性のみを用いた毒性予測モデルを構築・評価した(表4)。その結果、ランダムフォレスト(RF)と線形判別分析(LDA)の正答率は同程度であり、測定データと学習アルゴリズムに関係なく、正答率は物質別LOOCVよりもサンプル別LOOCVの方が高かった。また、2018年と2019年データを統合した2021年度データの正答率は、遺伝毒性と発がん性(「++」「+-」「-+」「--」)の4種類の毒

性予測ラベル)を組み合わせて用いた場合よりも約20ポイント向上した。

表4. 遺伝毒性のみを予測した場合の平均的な正答率

	2018年度データ		2019年度データ		2021年度データ	
学習アルゴリズム	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	0.90	0.94	0.47	0.69	0.53	0.59
LDA	0.89	0.91	0.44	0.55	0.59	0.65

・発がん性のみを用いた毒性予測モデル

2018年度測定データ、2019年度測定データ、2021年度測定データについて、毒性予測ラベルに発がん性のみを用いた毒性予測モデルを構築・評価した(表5)。

その結果、遺伝毒性のみを用いた場合と同様に、RFとLDAの正答率は同程度であった。ただし、2021年度測定データはRFよりもLDAの方が正答率は約30ポイント高くなった。また、測定データと学習アルゴリズムに関係なく、正答率はおおよそ物質別LOOCVよりもサンプル別LOOCVの方が高かった。一方、2021年度データの正答率は、物質毎、サンプル毎のLOOCVに関わらず、LDAによる毒性予測結果は83%であった。

表5. 発がん性のみを予測した場合の平均的な正答率

	2018年度データ		2019年度データ		2021年度データ	
学習アルゴリズム	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	0.92	0.97	0.55	0.70	0.53	0.59
LDA	0.89	0.95	0.60	0.72	0.83	0.83

③ 5-methyl-dCによるデータの標準化

2018年測定データと2019年度測定データを合わせ、5-methyl-dCを内部標準としてnormalizeを行った。そのピークリストを用いてPCA-DA解析を行なった結果、一部の「++」と「--」は分離しなかったが、「+-」「-+」はクラスターリングされることがわかった(図3)。

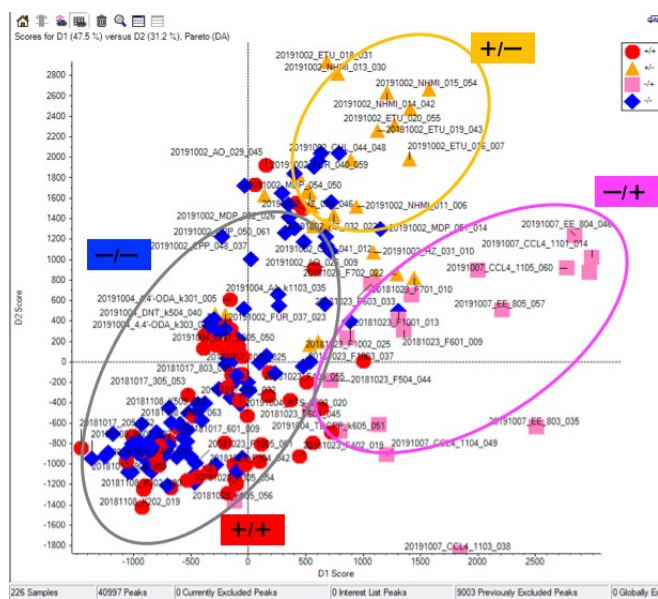


図3. 5-methyl-dCによる標準化とPCA-DA解析

さらに、毒性予測モデルの更なる正答率向上に向け、

毒性予測モデルの実用性の観点から、標準化したデータを用い、遺伝毒性のみの毒性予測ラベル（遺伝毒性「+」or「-」）と発がん性のみの毒性予測ラベル（発がん性「+」or「-」）を作成し、毒性予測モデルの検討を実施した。遺伝毒性のみの毒性（遺伝毒性「+」or「-」）と発がん性のみの毒性（発がん性「+」or「-」）に分けたPCA-DA解析の結果、遺伝毒性ではデータが分離されなかったが（図4）、発がん性では「+」と「-」で分離される傾向にあることがわかった（図5）。

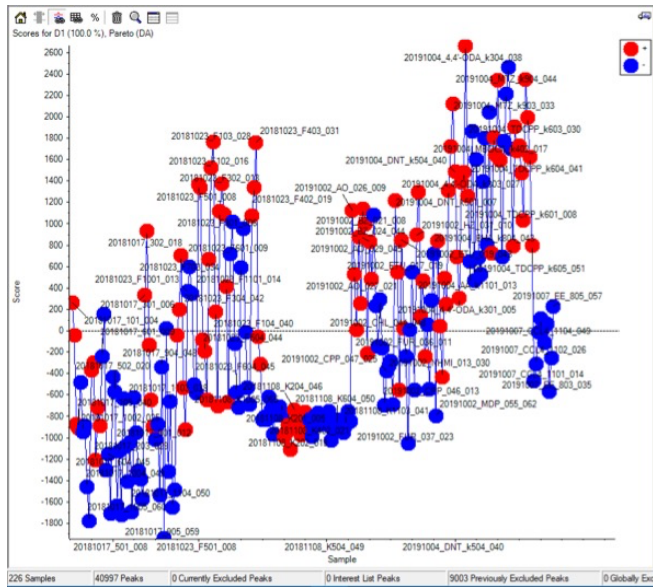


図4. 遺伝毒性の有無による分類

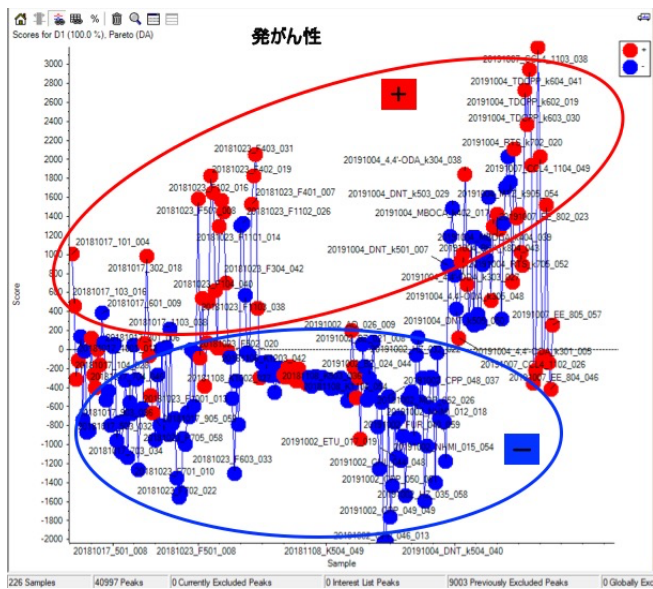


図5. 発がん性の有無による分類

D. 考察

2021年度測定データについてLDAを用いた遺伝毒性のみの予測結果（59%~65%）と発がん性のみの予測結果（83%）を比較すると、発がん性のみを予測した方が正答率は高かった。その理由として、遺伝毒性のみを予測した場合には「-」と「+」が明確に分離していないこと（図6）に対して、発がん性のみを予測した場合には「-」と「+」が比較的に分離していること（図7）に

起因すると考えられる。

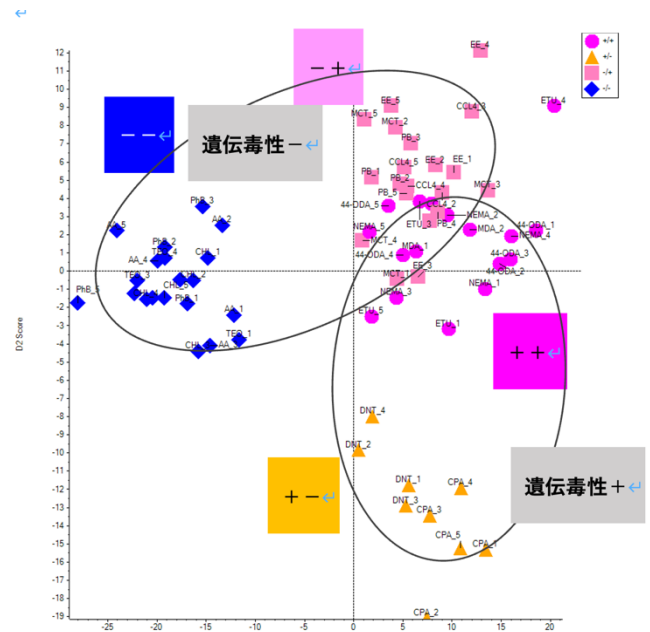


図6. 2021年度測定データのPCA-DA（遺伝毒性）

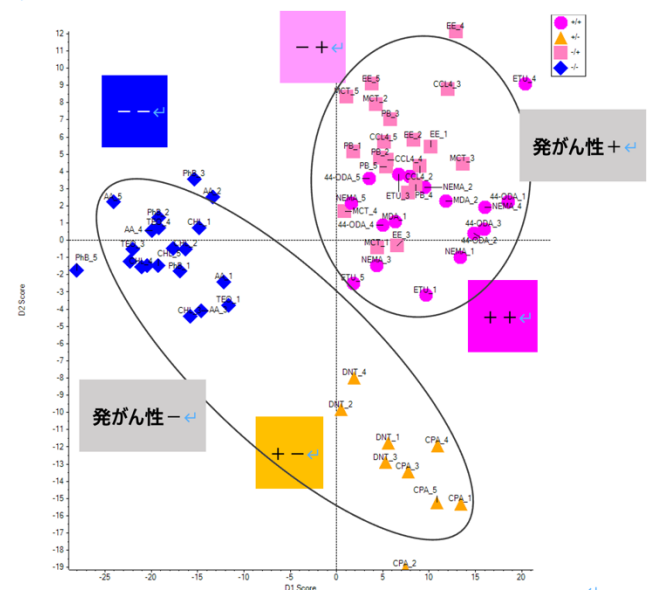


図7. 2021年度測定データのPCA-DA（発がん性）

今年度、2018年データセットと2019年データセットを統合し、5-methyl-dCのピークを内部標準として標準化を行った。PCA-DA解析を行ったところ、遺伝毒性と発がん性（「++」「+-」「-+」「--」）のうち、「+-」「-+」、それ以外、とクラスタリングできた。「++」と「--」の分離ができなかったが、保持時間や質量数の許容度など解析ソフトの条件の変更や、5-methyl-dC以外の内部標準での標準化を試み、より精度よく分離ができる方法を検討する必要がある。

E. 結論

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、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。また、今年度はさらに、2018年データセットと2019年データセットを統合し、全てのサンプルに含まれる5-methyl-dCのピークを内部標準としてデータの標準化を行なったうえでPCA-DA解析を行なった。その結果、一部の「++」と「--」の分離はできなかったが、「+-」と「-+」とそれ以外はそれぞれにクラスタリングされた。さらに、毒性予測モデルの更なる正答率向上に向け、毒性予測モデルの実用性の観点から、標準化したデータを用い、遺伝毒性のみの毒性予測ラベル（遺伝毒性「+」or「-」）と発がん性のみの毒性予測ラベル（発がん性「+」or「-」）を作成し、毒性予測モデルの検討を実施した。遺伝毒性のみの毒性（遺伝毒性「+」or「-」）と発がん性のみの毒性（発がん性「+」or「-」）に分けたPCA-DA解析の結果、遺伝毒性ではデータが分離されなかったが、発がん性では「+」と「-」で分離される傾向にあることがわかった。今後、このデータを用いて毒性予測モデルの検討を行うとともに、より適当な内部標準の検索を行い、標準化により正答率の向上に向けて検討していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic homo- and hetero-dimers of o-toluidine, o-anisidine, and aniline formed by in vitro metabolism. *Chem Res Toxicol*. 2022; 35: 1625-30.
- 2) 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.

2. 学会発表

- 1) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによる化学物質の遺伝毒性評価の現状と将来展望. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年6月)
- 2) 小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析. 第29回日本がん予防学術大会、京都 (2022年7月)
- 3) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、赤根弘敏、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. 細胞毒性を有

するo-Toluidineとo-Anisidineの尿中代謝物はラット膀胱上皮でALDH1A1を誘導する. 第29回日本がん予防学術大会、京都 (2022年7月)

- 4) Kobayashi T, Yoshioka Y, Kishimoto S, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. In vitro metabolic dynamics for p-semidine-type homo- and hetero-dimerization of monocyclic aromatic amines. 13th International Conference on Environmental Mutagens, Ottawa (2022年8月)
- 5) Kobayashi T, Toyoda T, Yoshioka Y, Murai N, Kishimoto S, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic metabolites of o-toluidine and o-anisidine induce ALDH1A1 in rat bladder epithelium. 13th International Conference on Environmental Mutagens, Ottawa (2022年8月)
- 6) Totsuka Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. 13th International Conference on Environmental Mutagens, Ottawa (2022年8月)
- 7) 戸塚ゆ加里、小宮雅美、松田知成、加藤護. Next generation sequencing technology elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 8) 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里. Establishment of novel genotoxicity assay system using organoids derived from murine normal epithelial tissues. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月、横浜)
- 9) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 10) 戸塚ゆ加里、小宮雅美、永井桃子、加藤護、松田知成. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望. 第35回発癌病理研究会、新潟 (2022年11月)
- 11) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析. 第51回環境変異原学会、広島 (2022年11月)
- 12) 坪井理、植嶋亜衣、久富優太、小田美光、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、相村春彦、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜. DNA鎖間架橋修復欠損細胞を用いたコリバクチン産生大腸菌の細胞毒性と遺伝毒性の評価. 第51回環境変異原学会、広島 (2022年11月)
- 13) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望. 第1回包括的がん緩和病態生理医療薬学研究会、東京 (2022年11月)
- 14) Yukari Totsuka. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human

cancer development. 12th AACR-JCA Joint
Conference, Maui (2022年12月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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
Toyoda T, Sone M, Matsushita K, Akane H, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Cho YM, Ogawa K.	Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX.	J Toxicol Sci.		in press	2023
Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Suzuki S, Oishi Y, Wanibuchi H.	A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks.	J Toxicol Sci.	36	123-9	2023
Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagibana Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H.	o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice.	Toxicology	488	153483	2023
Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K.	A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats.	Food Chem Toxicol.	175	113702	2023
Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Cho YM, Ogawa K.	Persistent γ -H2AX formation and expression of stem cell markers in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats.	Toxicol Sci.	189	51-61	2022

Uemoto Y, Katsuta E, Kondo N, Waniuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Hisada T, Terada M, Kato A, Okuda K, Sugiura H, Komura M, <u>Kato H</u> , Otsuga S, Takahashi S, Toyama T.	Low HECTD1 mRNA expression is associated with poor prognosis and may be correlated with increased mitochondrial respiratory function in breast cancer.	Am J Cancer Res.	12	1593-605	2022
<u>Toyoda T</u> , Ogawa K.	Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX: a review from analyses of 100 chemicals.	J Toxicol Pathol.	35	283-98	2022
<u>Toyoda T</u> , Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K.	Toxicological effects of two metabolites derived from o-toluidine and o-anisidine after 28-day oral administration to rats.	J Toxicol Sci.	47	457-66	2022
Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, <u>Wanibuchi H</u> , 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
<u>Suzuki S</u> , Asai K, <u>Gi M</u> , Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, <u>Wanibuchi H</u> .	Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung.	Journal of Toxicologic Pathology	35	247-54	2022
Saleh DM, Luo S, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Gunasekaran S, El-Gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohtani M, Tomono S, Hady R, Fukumachi K, Kanno J, Hirose A, Xu J, <u>Suzuki S</u> , 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

Ozeki T, Shimura T, Ozeki T, Ebi M, Iwasaki H, <u>Kato H</u> , Inaguma S, Okuda Y, Katano T, Nishie H, Takahashi S, Kataoka H.	The Risk Analyses of Lymph Node Metastasis and Recurrence for Submucosal Invasive Colorectal Cancer: Novel Criteria to Skip Completion Surgery.	Cancers (Basel)	14		2022
Oikawa D, <u>Gi M</u> , Kosako H, Shimizu K, Takahashi H, Shiota M, Hosomi S, Komakura K, <u>Wanibuchi H</u> , Tsuruta D, Sawasaki T, Tokunaga F.	OTUD1 deubiquitinase regulates NF- κ Bs- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways.	Cell Death Dis.	13	694	2022
Nishino T, Abe T, Kaneko M, <u>Yokohira M</u> , Yamakawa K, Imaida K, Konishi H.	GAREM1 is involved in controlling body mass in mice and humans.	Biochem Biophys Res Commun	628	91-7	2022
Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoyama T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, <u>Sugimura H</u> , Iwashita Y, <u>Totsuka Y</u> , Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M.	Induction of DNA Damage in Mouse Colon Tumors by Administration of Colibactin-producing Escherichia coli, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer.	In Vivo	36	628-34	2022
Nagai M, Iemura K, Kikkawa T, Namer S, Hattori S, Hagihara H, Nagata KI, Anzawa H, Kugisaki R, <u>Wanibuchi H</u> , Abe T, Inoue K, Kinoshita K, Miyakawa T, Osumi N, Tanaka K.	Deficiency of CHAMP1, a gene related to intellectual disability, causes impaired neuronal development and a mild behavioural phenotype.	Brain Commun.	4	fcac220	2022
Matsue T, <u>Gi M</u> , Shiota M, Tachibana H, <u>Suzuki S</u> , Fujioka M, Kakehashi A, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, <u>Wanibuchi H</u> .	The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling.	Cancer Sci.	113	2642-53	2022

Kondo N, Sakurai Y, Takata T, Kano K, Kume K, Maeda M, Takai N, Suzuki S, Eto F, Kikushima K, Wanibuchi H, Miyatake SI, Kajihara T, Oda S, Setou M, Aoki J, Suzuki M.	Persistent elevation of lysophosphatidylcholine promotes radiation brain necrosis with microglial recruitment by P2RX4 activation.	Sci Rep.	12	8718	2022
Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N.	Cytotoxic homo- and hetero-dimers of o-toluidine, o-anisidine, and aniline formed by in vitro metabolism.	Chem Res Toxicol.	35	1625-30	2022
Kato A, Naitoh I, Naiki-Ito A, Hayashi K, Okumura F, Fujita Y, Sanoh H, Nishi Y, Miyabe K, Inoue T, Hirano A, Takada H, Yoshida M, Horiyama Y, Natsume M, Kato H, Takahashi S, Kataoka H.	Class III beta-Tubulin Expression Is of High Prognostic Value in Selecting nab-Paclitaxel and Gemtuzumab as First-Line Therapy in Unresectable Pancreatic Cancer.	Pancreas.	51	372-9	
Kato A, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Hisada T, Uemoto Y, Terada M, Kato H, Komura M, Okuda K, Takahashi S, Toyama T.	Low TINAGL1 expression is a marker for poor prognosis in breast cancer.	J Cancer Res Clin Oncol.		doi.org/10.1007/s00432-022-04394-3	2022
Kato A, Kato H, Naitoh I, Hayashi K, Yoshida M, Horiyama Y, Kachi K, Asanoh G, Sahashi H, Toyohara T, Kuno K, Kito Y, Takahashi S, Kataoka H.	Use of Endoscopic Snare and Cell Block Technique as a Replacement for Conventional Brush for Diagnosing Malignant Biliary Strictures.	Cancers (Basel)		14	2022
Hisada T, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Osaga S, Fujita T, Asano T, Uemoto Y, Nishikawa S, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Sugiura H, Okuda	Co-expression effect of LLGL2 and SLC7A5 to predict prognosis in ERalpha-positive breast cancer.	Sci Rep.	12	16515	2022

Deguchi S, Tanaka H, Suzuki S, Natsumi S, Mori T, Miki Y, Yoshii M, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M.	Clinical relevance of tertiary lymphoid structures in esophageal squamous cell carcinoma.	BMC Cancer	22	699	2022
Chlopek M, Lasota J, Thompson LDR, Szczepaniak M, Kuzniacka A, Hincza K, Kubicka K, Kaczorowski M, Newford M, Liu Y, Agaimy A, Biernat W, Durzynska M, Dziuba I, Hartmann A, Inaguma S, Izicka-Swieszewska E, Kato H, Koczyński J, Michal M, Michal M, Peksa R, Prochorec-Sobieszek M, Starzynska A, Takahashi S, Wasag B, Kowalik A, Miettinen M.	A molecular genetics and immunohistochemical study of 90 cases and comprehensive review of the literature.	Mod Pathol.	35	1609-17	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
Arakawa N, Ushiki A, Abe M, Matsuyama S, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Miyashita K, Saito K, Nakamura R, Toyoda T, Ogawa K, Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiyama T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M.	Stratifin as a novel diagnostic biomarker in serum for diffuse alveolar damage.	Nat Commun.	13	5854	2022

<p>kane H, <u>Toyoda T</u>, Mizuta Y, Cho Y M, Ide T, Kosaka T, Tajima H, Aoya ma H, Ogawa K.</p>	<p>Histopathological and d immunohistochemical l evaluation for det ecting changes in bl ood hormone levels c aused by endocrine d isruptors in a 28-da y repeated-dose stud y in rats.</p>	<p>J Appl Toxicol</p>	<p>42(10)</p>	<p>1603-17</p>	<p>2022</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------	---------------	----------------	-------------

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 福島 伸一

次の職員の令和4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) 大阪公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 checked="" type="checkbox"/>	大阪公立大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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 公立大学法人大阪

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 福島 伸一

次の職員の令和4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) 大阪公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 checked="" type="checkbox"/>	大阪公立大学	<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 公立大学法人大阪

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 福島 伸一

次の職員の令和4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) 大阪公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 checked="" type="checkbox"/>	大阪公立大学	<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 5年 5月 9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4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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	名古屋市立大学	<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 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4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) 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5年3月30日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4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 checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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 寛 善行

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
- 研究者名 (所属部署・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。