

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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

令和2年度～令和4年度 総合研究報告書

研究代表者 鰐淵 英機

令和5年（2023）年 5月

## 目 次

I. 総合研究報告	
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. 分担総合研究報告	
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	----- 21
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	----- 28
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	----- 34
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	----- 41
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	----- 45
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	----- 50
魏 民	
7. DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価	----- 56
戸塚ゆ加里	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 63

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総合研究報告書

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

研究代表者 鰐淵 英機 大阪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による毒性や発がん性の標的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、令和2～4年度に非遺伝毒性肝発がん物 21 種類と、非発がん物質 11 種類の合計 32 種類の化学物質について、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った。上記の物質とともに Open TG-GATE に登録されている非遺伝毒性肝発がん物 15 種類と非肝発がん物質 42 種類を合わせた合計 89 種について、従来モデルで検討した結果、感度 39%、特異度 100%、正答率 75%と感度が低いことが確認出来た。そこで令和2年度に 14 遺伝子モデルを、令和3年度に高感受性モデルを、令和4年度は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。機序別統合モデルは、感度 64%(23/36)、特異度 94%(50/53)、正答率が 82%(73/89)と、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、まずは、「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」を含む 6 化学物質を用いたラット単回投与を行い、投与 24 時間後の肝臓におけるマーカー遺伝子（10 遺伝子）の発現データを qPCR で取得し、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（検出モデル-1）を用いて肝発がん性を予測した。その結果、「陽性」と判定されたものは、2 遺伝毒性肝発がん物質であった。しかし、「優先評価化学物質」の 1 物質含めた 3 遺伝毒性肝発がん物質は「陰性」と判定された。これまでに検討した 69 物質に対して、検出モデル 1 は遺伝毒性肝発がん物質を、感度 83%、特異度 95%、正答率 90%の精度で検出できた。次に、さらなる精度向上のため、偽陰性になった遺伝毒性肝発がん物質についても検出できる補完モデル（検出モデル-2）の開発を行った。これまでに検出モデル-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 種類について検出モデル-2 を用いて検討した結果、上述の 5 つの遺伝毒性発がん物質のうち 4 つが「陽性」と判定された。さらに、検出モデル-1 と検出モデル-2 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%の精度で検出可能であることが明らかになった。以上より、我々が 2 つの遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルを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。また、DNA アダクトーム解析による評価では、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルで得られた肝組織における DNA 損傷性評価を HRAM-アダクトーム法により検討し、遺伝毒性/発がん性予測モデルの構築を行った。令和2年度は検出モデルごとに予測精度が異なり、解析物質数を増やすと精度の低下を認めた。令和3～4年度は正答率向上に向け、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。その結果、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、肝臓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臓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臓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臓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臓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臓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臓がん物質を主体に、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、短期肝臓がん性総合評価スキームの確立を目指す。

「非遺伝毒性肝臓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臓がん物質かつ「優先評価化学物質」である5つの化学物質を含む合計20化学物質を、令和4年度は、「優先評価化学物質」を5つ含む新たな10化学物質についてラット28日間反復投与試験を実施し、肝臓を採取、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。令和4年度は、2つの非遺伝毒性肝臓がん物質について、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、令和2年度は新たに14遺伝子モデルを、令和3年度は高感受性モデルを、令和4年度は、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）。

「遺伝毒性肝臓がん物質超短期検出法」について、令和2年度は、新たに「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」を含む6化学物質について検討を行った。令和3年度は、陰性と判定された遺伝毒性陽性で発がん性不明の「監視化学物質」1種類及び偽陰性になった遺伝毒性肝臓がん物質3種類について、投与用量を上げて再検討を実施した。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、遺伝毒性肝臓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臓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臓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、非遺伝毒性肝臓がん物質の検出（サポートベクターマシンによる数理学的アルゴリズムによるモデル）及び発がん機序に基づいた分類を行い、検出法の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 $\alpha$ アゴニスト（CFB, WY）に属する化学物質2種において、共通して対照群との発現差がWelch T値が5以上となる遺伝子を選出した。次にそれぞれの属する化学物質において対照群との平均した発現差が4倍以上異なるとともに、42の非発がん物質で発現変動平均が0.5以下となる遺伝子を選出した。加えて、選出した遺伝子が、各所属化学物質の8割以上で変化するとともに、非発がん物質において2倍以上変化する物質が4つ以下となる遺伝子を選出した（14遺伝子モデル）。

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

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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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2年度は、優先評価化学物質を2物質含む、非遺伝毒性肝臓がん物質11種および非発がん物質5種の合計16物質について検討した。発がん物質は、2年間

のがん原性試験に用いられた投与量および経路で投与した。大阪公立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質 3 種：Thioacetamide (TAA; 0.5 g/kg)、11-Aminoundecanoic acid (AUDA; 15 g/kg)、di(2-Ethylhexyl)phthalate (DEHP; 12 g/kg) と、非肝発がん物質 1 種：Quercetin dihydrate (QDH; 50 g/kg) を摂餌投与した。香川大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質 2 種：Phenobarbital, sodium (PB; 500 mg/L)、1,4-Dioxane (1,4-D; 5 g/L) と、非肝発がん物質 2 種：Phytic acid (PhA; 2.5%)、Cyclohexanone (CHN; 6.5 g/L) を飲水投与した。国立衛研担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質 3 種：Clofibrate (CFB; 5 g/kg)、Chlorendic acid (CRA; 1.25 g/kg)、Ponceau 3R (P3R; 50 g/kg) と、非肝発がん物質 1 種：Caprolactam (CPL; 7.5 g/kg) を摂餌投与した。名古屋市立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質 3 種：Decabromodiphenyl oxide (DBDPO; 50 g/kg)、dl-Ethionine (DL-ET; 1 g/kg)、Doxylamine succinate (DOX; 2 g/kg) と、非肝発がん物質 1 種：Hexachlorophene (HCP; 150 mg/kg) を摂餌投与した。

令和 3 年度は、優先評価化学物質かつ非遺伝毒性肝発がん物質である 5 物質含む、非遺伝毒性肝発がん物質 19 種および非発がん物質 1 種の合計 20 物質について検討した。また、感度の向上を目指し、令和 2 年度の一部物質について投与用量及び投与方法を変更して検討した。発がん物質は、過去の文献上で 4 週間投与時に最大投与量と推察される量を投与した。大阪公立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質 6 種：TAA (45 mg/kg/day)、PB (100 mg/kg/day)、Methyl carbamate (MCB; 500 mg/kg/day)、1,4-D (1000 mg/kg/day)、Methyleugenol (MEG; 250 mg/kg/day)、2-Nitrotoluene (2NT; 300 mg/kg/day) を強制胃内投与した。香川大学担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質 4 種：Chlorendic acid (CRA; 5 g/kg)、N,N-Dimethylformamide (DMF; 5 g/kg)、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP; 50 g/kg) を混餌投与、Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride (PHMB; 2→1g/kg) を飲水投与した。国立衛研担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質 5 種：CFB (300 mg/kg/day)、Hexachlorobenzene (HCB; 300 mg/kg/day)、Wy-14643 (WY; 100 mg/kg/day)、Chlorobenzene (CB; 250 mg/kg/day) および Furan (30 mg/kg/day) を強制胃内投与した。名古屋市立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質 4 種：DL-ET (200 mg/kg/day)、DOX (200 mg/kg/day)、Methapyrilene hydrochloride (MP; 100 mg/kg/day)、Nitrobenzene (NB; 125→62.5 mg/kg/day) および非肝発がん物質 1 種：HCP (20 mg/kg/day) を強制胃内投与した。

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。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 (EGL; 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：Nitrilotriacetic 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 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（鱈淵、魏）

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

表 1. 令和 2 年度に検討した遺伝毒性肝発がん物質（検出モデル-1）

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

# LD50の1/3に相当する用量。

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

実験 2（令和 3 年度）では、令和 2 年度に陰性と判定された 4 物質（監視対象化学物質である DB-134、優先評価化学物質である OPD、既知の遺伝毒性肝発がん物質である Safrole 及び ADBAQ）を用いた。DB-134 及び ADBAQ の投与用量を令和 2 年度の 1000 mg/kg から OECD TG420 急性経口毒性試験において定められている最高用量の 2000 mg/kg に上げた。OPD の投与用量を令和 2 年度の 170 mg/kg (1/3 of LD50) から 340 mg/kg (2/3 of LD50) 及び 510 mg/kg (LD50) に、Safrole の投与用量を令和 2 年度の 650 mg/kg (1/3 of LD50) から 1300 mg/kg

(2/3 of LD50)と1950 mg/kg (LD50)にそれぞれ上げた。なお、溶媒対照群(対照群)として0.5% MC投与群を設けた。

実験3(令和4年度)では、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2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OPD、既知の遺伝毒性肝発がん物質である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(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、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2. 令和4年度に検討した遺伝毒性肝発がん物質(検出モデル2)

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
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)

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3に示す。

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シドに消化した後、LC-TOF MSに供しDNA付加体の網羅解析を行った。得られたデータはSCIEX社が提供するバイオインフォマティクス解

析ソフトウェアを用い、デオキシリボヌクレオシドに特徴的なニュートラルロス(-116.04736)及び各種核酸に特異的なニュートラルロス(-152.0572; dG, -136.0623; dA, -112.0511; dC, -127.0508; dT)を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように系をデザインした。

表3. DNA アダクトーム解析に使用した化学物質

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

令和2年度は得られたすべてのデータを用い、主成分判別分析(PCA-DA)により解析した。

令和3-4年度は、これらのうち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。

(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)

令和2年度の動物実験において、各物質を4週間投与後に屠殺・剖検した際に、TAA、PBおよびPhAは、有意な体重増加抑制を認めた。特にPhAは毒性のため4週目に2匹死亡した。また、DL-ETも体重増加抑制傾向を認めたが、最終屠殺時には有意な差は見られなかった。肝重量は、DEHP、CHN、CRA、P3R、CFBおよびDBDPO投与により、絶対および相対肝重量が有意に増加した。一方、PhAにおいては、絶対肝重量の低下を認めたが相対肝重量には変化を認めなかった。採取された肝組織について検討した結果、TAA、DEHP、PB、DBDPOにおいて肝細胞肥大や空胞変性などの変化を認めた。また、AUDA、CHN、CRA、P3R、CFBおよびDL-ETにおいても軽度ながら肝細胞肥大などの変化が存在した。

令和3年度の動物実験経過中、PHMB群において実験開始1週目に著明な体重減少が見られたため、以降は用量を2g/kgから1g/kgへ減量して投与することとした。投与開始後3週目以降、HCB投与群の2匹が投与前

後に振戦を呈し、25日目に斃死した。MPH群は、17および28日目に1匹ずつ投与直後に全身痙攣を起こして死亡した。NB群は9日目に2匹にメトヘモグロビン血症と考えられる麻痺が出現し、10日目に1匹死亡したため、1日の休業後投与量を半量(62.5 mg/kg/day)に変更した。各物質を4週間投与後に屠殺・剖検した際に、TAA、MCB、2NT、DEHP、WY、CB、Furan、MP、DL-ET、NB群で有意な体重増加抑制を認めた。また、肝重量は、DEHP、CF、HCB、WY、Furan投与により、絶対及び相対肝重量が有意に増加した。MP、DL-ET投与により、絶対肝重量が有意に低下した。TAA、PB、1,4-D、2NT、CB、DOX、NB、HCP投与により相対肝重量が有意に増加した。採取された肝組織について検討した結果、TAA、PB、1,4-D、2NT、DMF、DEHP、CF、HCB、WY、CB、Furan、MP、DL-ET群において肝細胞肥大や空胞変性などの組織学的変化を認めた。また、MEG、CRA、PHMB、DOX、NB群においても軽度ながら肝細胞肥大などの変化が存在した。

令和4年度の動物実験開始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予測モデルを用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出を行った。これまで検証した全ての89化学物質について、従来モデルおよび令和2～3年度に開発した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。

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)

従来モデルにおいて、特異度は100% (53/53) と高いものの、感度が39%(14/36)と低いため、令和2年度に非遺伝毒性肝発がん物質で特異的な発現変動を示す遺伝

子を選出した14遺伝子モデルを開発し検証したところ、感度53%(19/36)と向上した。しかしながら、まだ感度は5割近くと低いため、令和3年度に、高感受性モデルを開発し、感度が67%(24/36)と大幅な改善を認めた。しかしながら、特異度が下がっており改善が望まれ結果となった。

そこで令和4年度に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%(23/36)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%(50/53)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 $\alpha$ 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)

令和3年度に、令和2年度に用いた非遺伝毒性発がん物質の一部について、投与方法を強制胃内投与に変更した結果、従来モデルおよび14遺伝子モデルいずれも1物質陽性判定が増え、感度は上昇したものの大きな改善はされなかった(表6,7)。

表6. 投与方法および投与濃度変更による発がん性判定結果(従来モデル)

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

表7. 投与方法および投与濃度変更による発がん性判定結果(14遺伝子モデル)

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

表8. 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	×	×	○	○	○	○

令和4年度は、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8)。

## 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)

### 1) 実験1(令和2年度)

qPCRで取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデル-1に入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った(表1)。本モデルでは、遺伝毒性ラット肝発がん物質を「陽性」、その他の物質を「陰性」と判定する。その結果、「陽性」と判定されたものは、遺伝毒性肝発がん物質である2物質(2-NF, 2-AAQ)であった。しかし、それ以外の3遺伝毒性肝発がん物質は「陰性」と判定された。遺伝毒性陽性で発がん性不明であるDB-134は「陰性」と判定された。

### 2) 実験2(令和3年度)

取得した遺伝子発現データを検出モデル-1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。その結果、本年度に検討した4物質(DB-134、OPD、Safrole及びADBAQ)はすべて「陰性」と判定された。

### 3) 実験3(令和4年度)

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(表2)。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-2が確立できた。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)

令和2年度は各種化学物質を投与したラット肝臓DNAのアダクトーム解析を行なった。LDA解析を行なったところ、2018データセット単独、2019データセット単独、及び2018+2019データセットのいずれにおいても、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに綺麗に分離されることがわかった。Leave-One-Out交差検証により化学物質の遺伝毒性/発がん性を予測するモデルを機械学習手法(ランダムフォレストを使用)を用いて試作した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いて2018+2019統合データセットに対して予測を行ったところ、遺伝毒性/肝発がん性の予測結果は49%、遺伝毒性の予測結果が50%、肝発がん性の予測結果は65%と2018年データセット単独の結果と比べ正答率が低くなった(表9)。

表9. 遺伝毒性の予測結果

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

令和3年度は、2018年および2019年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し、今年度HRAM-アダクトームの再分析を実施した結果を図1に示す(2021データ)。LDA解析を行なったところ、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。

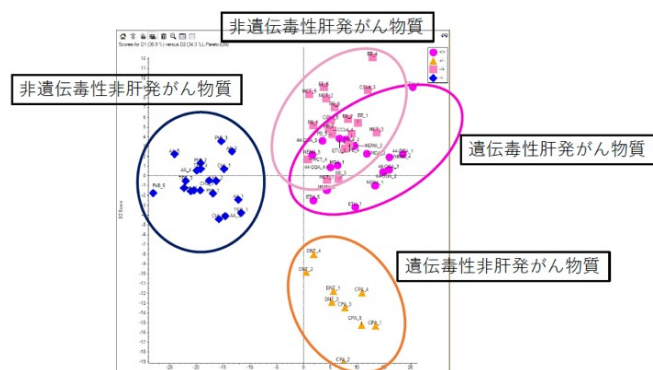


図1. 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(LDA解析による)

Leave-One-Out交差検証により化学物質の遺伝毒性/発がん性を予測するモデルを機械学習手法(ランダムフォレストを使用)を用いて試作した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いて2021年データセットに対して予測を行ったところ、予測結果が低いことがわかった(表10)。

表10. 遺伝毒性の予測結果

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

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

一方、毒性ラベルを「--」と「それ以外」に置き換えた場合では、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。



### Leave-One-Out 交差検証による正答率の評価

令和4年度は、それまでの結果から、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%）。毒性的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（図2）、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2、表11）。

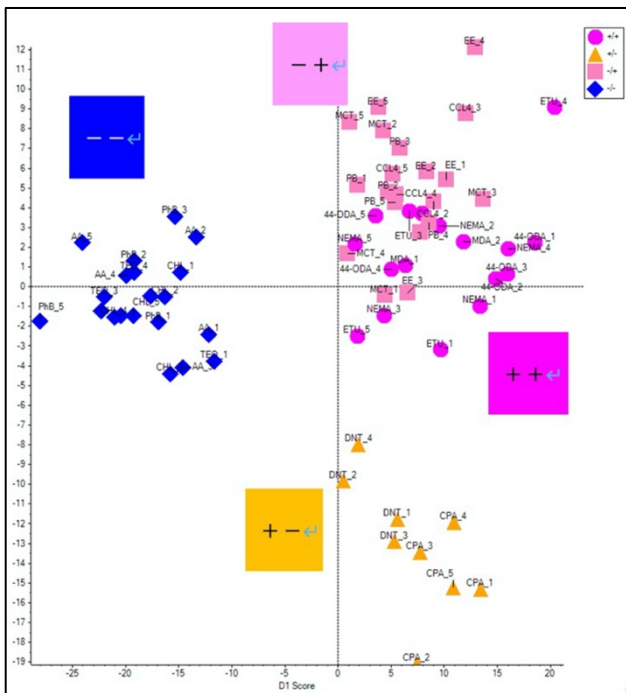


図2. 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価（PCA-DAによる）

表11. 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	3	5	0.6	2	0	3	0
EE	+-	2019	5	5	1	0	0	5	0
MCT	+-	2018	1	5	0.2	2	0	1	2
PB	+-	2018	0	5	0	1	0	0	4
CPA	+-	2018	0	5	0	0	0	4	1
DNT	+-	2019	0	4	0	2	0	1	1
44-ODA	++	2019	2	5	0.4	2	0	3	0
ETU	++	2019	0	5	0	0	0	4	1
MDA	++	2018	1	2	0.5	1	0	1	0
NEM A	++	2018	1	5	0.2	1	0	4	0
合計			31	66	0.47				

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%）。毒性的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3）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12）。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。

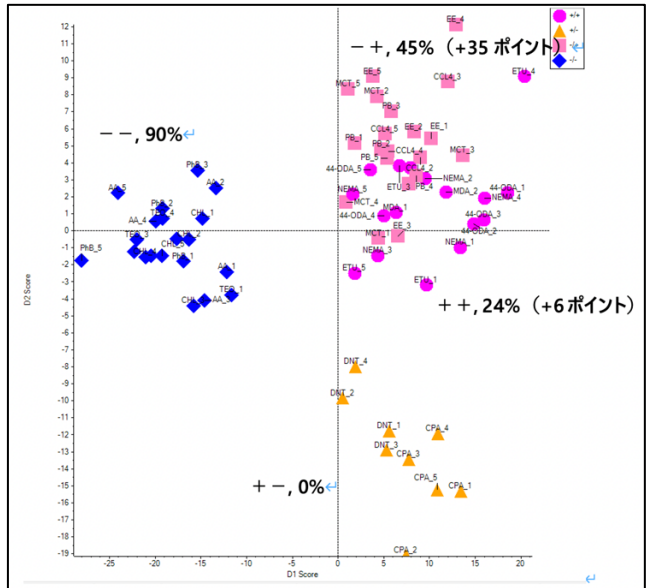


図3. サンプル毎の分類クラス別正答率。括弧内の数値は物質毎の正答率からの変化

表12. 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	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
NEM A	++	2018	1	5	0.2	1	0	4	0
合計			23	66	0.35				

### 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13）。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 13. 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 14)。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 14. 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

5-methyl-dC によるデータの標準化

2018 年測定データセットと 2019 年測定データセットを統合し、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、「++」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 4)。

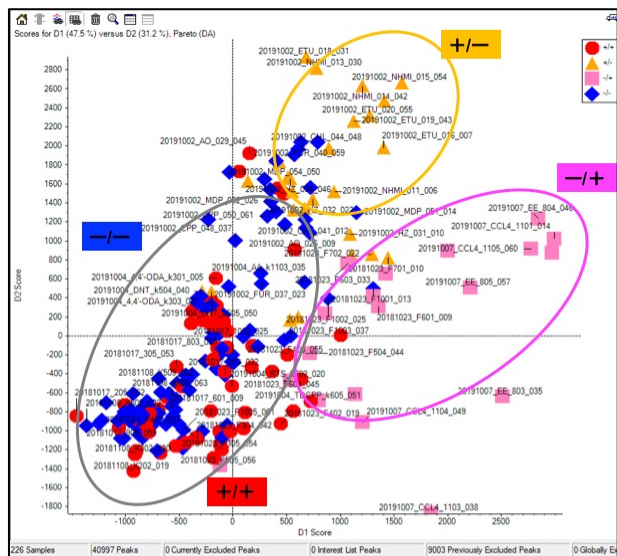


図 4. 5-methyl-dC による標準化と PCA-DA 解析

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、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, 6)。

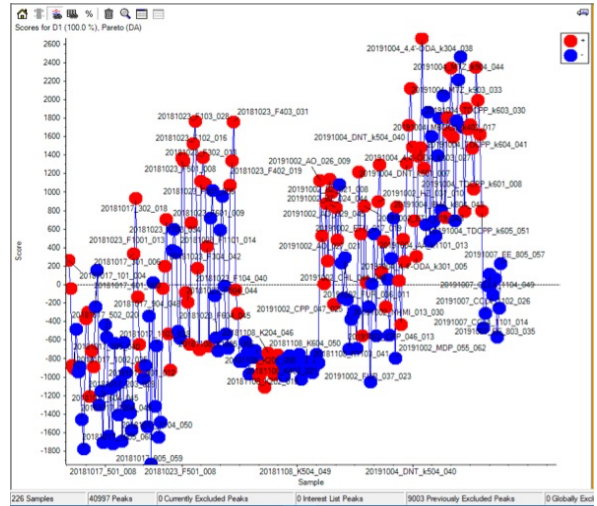


図 5. 遺伝毒性の有無による分類

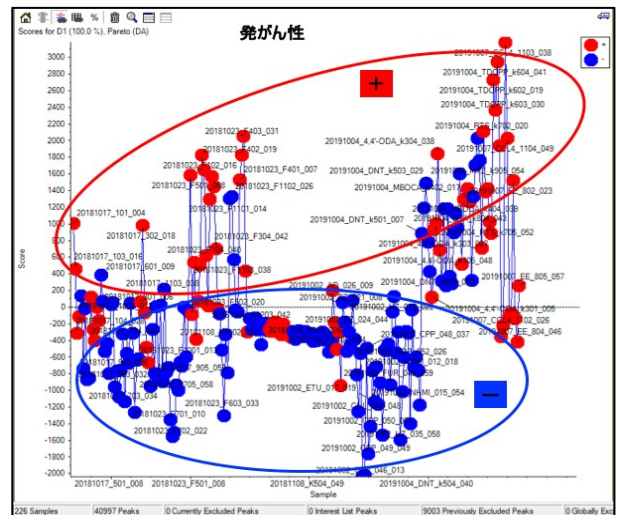


図 6. 発がん性の有無による分類

D. 考察

令和2~4年度に動物実験を行い新たに解析した32物質およびOpen TG-GATEに登録されている57物質の合計89物質について、従来モデルでは特異度100%である一方、感度が4割近くと低い結果であった。令和2年度に開発した14遺伝子モデルで感度が向上したものの、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。令和3年度には感度の改善を目指し、高感受性モデルを開発し67%と感度向上を認めたものの、特異度が83%と低下しており改善する必要があった。令和4年度に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作成した機序別統合モデルは、高感受性モデルに近い感度64%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(94%)が得られ、高精度のモデルが開発でき

たと考えられる。

また、令和3年度に一部の非遺伝毒性肝発がん物質について投与濃度や投与量を変更し再検討した結果、一部で陽性判定が増えたものの、大きな改善には至らなかった。令和4年度に行っ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。

我々が構築した検出モデル-1は遺伝毒性肝発がん物質を、感度83%、特異度95%、正答率90%の精度で検出できることが示された。一方、遺伝毒性肝発がん物質であるOPD、Safrole及びADBAQが2000 mg/kgあるいはLD50用量においても、「陰性」と判定されたことから、検出モデル-1の検出力に限界がある可能性が示された。

新たに作成した検出モデル-2において、これまでに検出モデル-1を用いた検討において、偽陰性となった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、今までの検出モデル-1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モデル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はいずれのモデルにおいても「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ことが明らかになった。

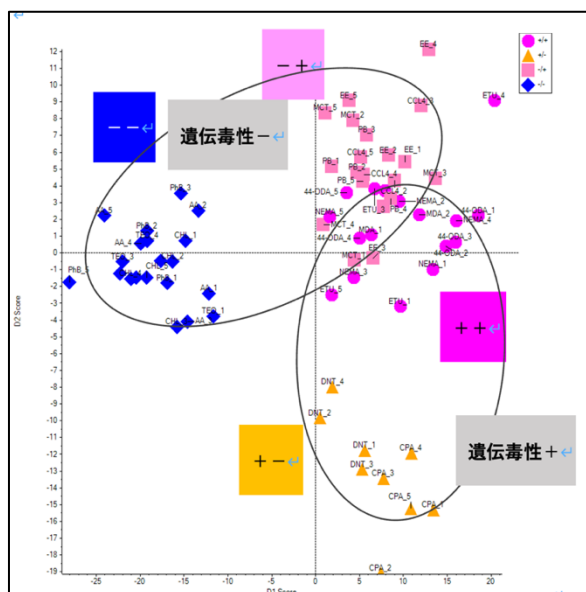


図7. 2021年度測定データのPCA-DA (遺伝毒性)

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では「-」と「+」が明確に分離していないこと(図7)に対して、発がん性のみを予測した場合は「-」と「+」が比較的に分離していること(図8)に起因すると考えられる。

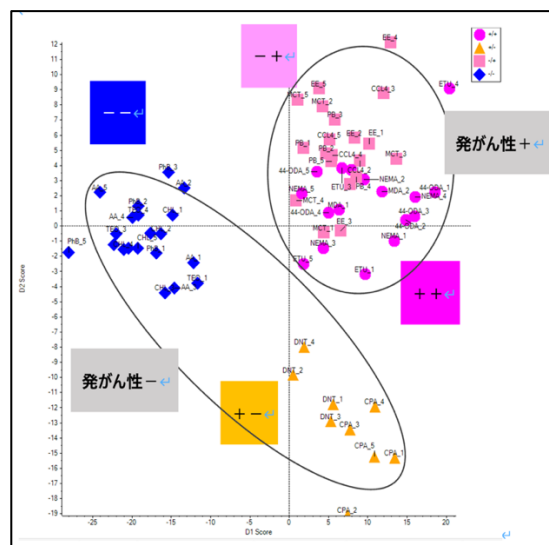


図8. 2021年度測定データのPCA-DA (発がん性)

令和4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。遺伝毒性の有無、発がん性の有無のみで分類した結果、発がん性の有無ではデータの分離傾向が観察され、2021年データセットのLDAを用いた予測結果と一致した。今後、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

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。令和4年度に作成した機序別統合モデルは、令和2~3年度に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  $\gamma$ -H2AX. *J Toxicol Sci.* in press
- 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) 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.
- 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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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. FXP3 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; doi.org/10.1007/s00432-022-04394-3.
  - 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.
  - 30) Yokohira M, Oshima M, Yamakawa K, Ye J, Nakano-Narusawa Y, Haba R, Fukumura Y, Hirabayashi K, Yamaguchi H, Kojima M, Okano K, Suzuki Y, Matsuda Y. Adequate tissue sampling for the assessment of pathological tumor regression in pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2021; 11: 6586.
  - 31) Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y.

- Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharm.* 2021; 595: 120241.
- 32) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Cho YM, Akagi JI, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K. Expression of stem cell markers as useful complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for gamma-H2AX. *Arch Toxicol.* 2021; 95: 715-26.
  - 33) Yamada T, Toyoda T, Ide T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Neuromuscular and vascular hamartoma of the small intestine in an F344 rat. *J Toxicol Pathol.* 2021; 34: 113-7.
  - 34) Tsuda H, Yoshida M, Akiyama F, Ohi Y, Kinowaki K, Kumaki N, Kondo Y, Saito A, Sasaki E, Nishimura R, Fujii S, Homma K, Horii R, Murata Y, Itami M, Kajita S, Kato H, Kurosumi M, Sakatani T, Shimizu S, Taniguchi K, Tamiya S, Nakamura H, Kanbayashi C, Shien T, Iwata H. Nuclear grade and comedo necrosis of ductal carcinoma in situ as histopathological eligible criteria for the Japan Clinical Oncology Group 1505 trial: an interobserver agreement study. *Jpn J Clin Oncol.* 2021; 51: 434-43.
  - 35) Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-(1-menthoxy)ethanol in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2021; 34: 309-17.
  - 36) Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.* 2021; 112: 7-15.
  - 37) Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, Totsuka Y, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. *In Vivo.* 2021; 35: 2107-14.
  - 38) Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2021; 259: 3127-36.
  - 39) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 2021; 336: 32-8.
  - 40) Subhawa S, Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Komura M, Nagano-Matsuo A, Yeewa R, Inaguma S, Chewonarin T, Banjerdpongchai R, Takahashi S. Suppressive Effect and Molecular Mechanism of *Houttuynia cordata* Thunb. Extract against Prostate Carcinogenesis and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers (Basel).* 2021; 13.
  - 41) Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H. Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability. *Cell Rep.* 2021; 37: 109988.
  - 42) Nishikawa S, Uemoto Y, Kim TS, Hisada T, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Dong Y, Sugiura H, Okuda K, Kato H, Osaga S, Takahashi S, Toyama T. Low RAI2 expression is a marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2021; 187: 81-93.
  - 43) Nakano-Narusawa Y, Yokohira M, Yamakawa K, Ye J, Tanimoto M, Wu L, Mukai Y, Imaida K, Matsuda Y. Relationship between Lung Carcinogenesis and Chronic Inflammation in Rodents. *Cancers (Basel).* 2021; 13.
  - 44) Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, Kato H, Naiki-Ito A, Watanabe K, Nagayasu Y, Hosokawa Y, Takiguchi S, Kasugai K, Kasai K, Inaguma S, Takahashi S. PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients. *Virchows Arch.* 2021; 479: 277-84.
  - 45) Mori T, Tanaka H, Suzuki S, Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2021; 112: 1746-57.
  - 46) Matsuyama N, Naiki T, Naiki-Ito A, Chaya R, Kawai T, Etani T, Nagai T, Kato H, Kubota Y, Yasui T. Novel case of androgen receptor-positive cancer of unknown primary without serum prostate-specific antigen elevation that became progression free in the long term after primary combined androgen blockade. *IJU Case Rep.* 2021; 4: 59-63.
  - 47) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Specific expression of survivin, SOX9, and CD44 in renal tubules in adaptive and maladaptive repair processes after acute kidney injury in rats. *J Appl Toxicol.* 2021; 41: 607-17.
  - 48) Matsushita K, Takasu S, Ishii Y, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. In vivo mutagenicity and tumor-promoting activity of

- 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of gpt delta rats. *Arch Toxicol.* 2021; 95: 3117-31.
- 49) Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabenjakul W, Paitoonpong L, Handley FG, Bernabe KG, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I. U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. *Virology.* 2021; 555: 71-7.
- 50) Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y. Establishment of Novel Genotoxicity Assay System Using Murine Normal Epithelial Tissue-Derived Organoids. *Front Genet.* 2021; 12: 768781.
- 51) Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N(4)-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 2021; 34: 912-9.
- 52) Kawata K, Baba A, Shiota M, Wanibuchi H, Baba Y. ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *J Biochem.* 2021; 170: 483-8.
- 53) Kato H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* 2021; 42: 940-50.
- 54) Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 3613.
- 55) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 1216.
- 56) Kachi K, Kato H, Naiki-Ito A, Komura M, Nagano-Matsuo A, Naitoh I, Hayashi K, Kataoka H, Inaguma S, Takahashi S. Anti-Allergic Drug Suppressed Pancreatic Carcinogenesis via Down-Regulation of Cellular Proliferation. *Int J Mol Sci.* 2021; 22.
- 57) Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, Suzuki S, Yabata H, Koizumi R, Moriyoshi H, Yazawa I. Selective extension of cerebral vascular calcification in an autopsy case of Fahr's syndrome associated with asymptomatic hypoparathyroidism. *Neuropathology.* 2021; 41: 387-95.
- 58) Isobe T, Naiki T, Naiki-Ito A, Kawai T, Etani T, Nagai T, Nozaki S, Kobayakawa Y, Iwatsuki S, Matsuyama N, Kato H, Kawai N, Yasui T. Rare case of immunoglobulin G4-related disease arising in gonadal glands with long-term remission without steroid treatment: Discussion and literature review. *IJU Case Rep.* 2021; 4: 188-91.
- 59) Aoyama Y, Naiki-Ito A, Xiaochen K, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Inaguma S, Tsuda H, Tomita M, Matsuo Y, Takiguchi S, Takahashi S. Lactoferrin Prevents Hepatic Injury and Fibrosis via the Inhibition of NF-kappaB Signaling in a Rat Non-Alcoholic Steatohepatitis Model. *Nutrients.* 2021; 14.
- 60) Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Matsuda Y, Imaida K. Lung proliferative lesion-promoting effects of left pulmonary ligation in A/J female mice. *Pathol Int.* 2020; 70: 340-7.
- 61) Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 2020; 12.
- 62) Uemoto Y, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Asano T, Hisada T, Nishikawa S, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Okuda K, Sugiura H, Kato H, Takahashi S, Toyama T. Sentinel lymph node biopsy may be unnecessary for ductal carcinoma in situ of the breast that is small and diagnosed by preoperative biopsy. *Jpn J Clin Oncol.* 2020; 50: 1364-9.
- 63) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2020; 96: 180-7.
- 64) Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani T. Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-resistant bladder cancer. *Cancer Lett.* 2020; 479: 89-99.
- 65) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K,

- Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 2020; 33: 1907-14.
- 66) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
- 67) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. *Toxicology.* 2020; 429: 152325.
- 68) Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the association with prognosis and treatment. *PLoS One.* 2020; 15: e0238120.
- 69) Nozaki S, Naiki T, Naiki-Ito A, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T. Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis. *Andrology.* 2020; 8: 1895-906.
- 70) Nakano-Narusawa Y, Yokohira M, Yamakawa K, Saoo K, Imaida K, Matsuda Y. Single Intratracheal Quartz Instillation Induced Chronic Inflammation and Tumorigenesis in Rat Lungs. *Sci Rep.* 2020; 10: 6647.
- 71) Nakanishi H, Sawada T, Kaizaki Y, Ota R, Suzuki H, Yamamoto E, Aoki H, Eizuka M, Hasatani K, Takahashi N, Inagaki S, Ebi M, Kato H, Kubota E, Kataoka H, Takahashi S, Tokino T, Minamoto T, Sugai T, Sasaki Y. Significance of gene mutations in the Wnt signaling pathway in traditional serrated adenomas of the colon and rectum. *PLoS One.* 2020; 15: e0229262.
- 72) Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2020; 41: 1145-57.
- 73) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 4085-97.
- 74) Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis.* 2020; 41: 368-76.
- 75) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 2020; 25.
- 76) Kishi S, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Kanie S, Hashimoto N, Saoo K, Yokohira M, Imaida K, Matsuda Y. Preexisting diabetes mellitus had no effect on the no-observed-adverse-effect-level of acetaminophen in rats. *J Toxicol Sci.* 2020; 45: 151-62.
- 77) Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ.* 2020; 42: 16.
- 78) Kato T, Matsuo Y, Ueda G, Aoyama Y, Omi K, Hayashi Y, Imafuji H, Saito K, Tsuboi K, Morimoto M, Ogawa R, Takahashi H, Kato H, Yoshida M, Naitoh I, Hayashi K, Takahashi S, Takiguchi S. Epithelial cyst arising in an intrapancreatic accessory spleen: a case report of robotic surgery and review of minimally invasive treatment. *BMC Surg.* 2020; 20: 263.
- 79) Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Toyama T, Takahashi S. The standard form of CD44 as a marker for invasion of encapsulated papillary carcinoma of the breast. *Pathol Int.* 2020; 70: 835-43.
- 80) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21.
- 81) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagai T, Etani T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin



- pathway. *Cancer Sci.* 2020; 111: 1165-79.
- 82) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 927-37.
2. 学会発表
- 1) 鰐淵英機、魏民. 職業曝露によるがん発生の要因解明と予防研究への展開. 第 27 回がん予防学会総会. Web 開催 (2020 年 9 月)
  - 2) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase阻害剤apocyninによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第109回日本病理学会総会、Web開催 (2020年8月)
  - 3) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. ラット膀胱尿路上皮のニコチンによる増殖はNADPH oxidase阻害剤apocyninにより抑制される. 第79回日本癌学会学術総会、Web開催 (2020年10月)
  - 4) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明. 第 93 回産業衛生学会、Web 開催 (2020 年 4 月)
  - 5) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催 (2020 年 6 月)
  - 6) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020 年 10 月)
  - 7) 梯アンナ、鈴木周五、魏民、鰐淵英機. NASH 肝発がんにおける特異的候補分子および新規マーカーとして CACHD1 の役割. 第 79 回日本癌学会学術総会、広島、Web 開催 (2020 年 10 月)
  - 8) 鰐淵英機. 日本毒性病理学会のグローバル戦略. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
  - 9) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
  - 10) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
  - 11) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2 の解明. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
  - 12) 豊田武士、松下幸平、山田貴宣、赤木純一、森川朋美、小川久美子. 腎発がん物質早期検出指標としての  $\gamma$ -H2AX の応用可能性：用量相関性の検討. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催、(2021 年 1 月)
  - 13) 豊田武士、小川久美子. ラット膀胱粘膜における  $\gamma$ -H2AX 形成を指標とした芳香族アミンの膀胱傷害性および発がん性評価. 第 79 回日本癌学会学術総会、広島県、(2020 年 10 月)
  - 14) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子. オルト-トルイジン類似構造を持つ芳香族アミンによるラット膀胱傷害および遺伝子発現解析. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催、(2020 年 6 月)
  - 15) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、井手鉄哉、小川久美子. ラット肝臓標本を用いた肝発がん物質早期検出のためのバイオマーカーの探索. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催、(2021 年 1 月)
  - 16) 山田貴宣、原田賢吾、豊田武士、小川久美子、中山千里、田川義章、奥山学. SD ラットに認められた真正半陰陽の一例. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催、(2021 年 1 月)
  - 17) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 急性腎障害から慢性腎臓病への進展における CD44 の役割. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催、(2021 年 1 月)
  - 18) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、薮島由二. RNA アプタマーを利用した組織再生を促進する新規機能性医用材料の創製に関する研究. 第 58 回日本人工臓器学会大会、高知県、(2020 年 11 月)
  - 19) 赤木純一、豊田武士、小川久美子. 肝発がん物質投与ラット肝細胞における  $\gamma$ -H2AX 誘導と細胞増殖活性の相関. 第 79 回日本癌学会学術総会、広島県、(2020 年 10 月)
  - 20) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 腎虚血再灌流障害モデルラットを用いた急性腎障害から慢性腎臓病への進展メカニズムの解明. 第 163 回日本獣医学会学術集会、Web 開催、(2020 年 9 月)
  - 21) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. mRNA-microRNA 統合解析を用いた腎代償性メカニズムの包括的解析. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催、(2020 年 6 月)
  - 22) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、高橋智. エラグ酸の膀胱癌抑制効果と膀胱癌におけるレジスチンの効果の検討. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、浜松 (2021 年 1 月)
  - 23) Kato H, Naiki-Ito A, Komura M, Inaguma S, Takahashi S. Ellagic acid prevents pancreatic carcinogenesis in hamster model. The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Hiroshima (2020.10)
  - 24) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、山下依子、稲熊真悟、高橋 智. Luteolin は STAT3 経路と DPD 発現を低下させ膀胱癌を抑制する. 第 109 回日本病理学会総会、福岡 (2020 年 4 月)

- 25) 戸塚ゆ加里 NGS によるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望 第 47 回日本毒性学会学術年会シンポジウム (2020 年 6 月 Web 開催)
- 26) 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 がん予防学術大会 (2020 年 9 月 Web 開催)
- 27) 戸塚ゆ加里 Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach 第 79 回癌学会 (2020 年 10 月、広島)
- 28) 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによりがんの要因を解明する 第 2 回 三陸包括的緩和医療研究会 (2020 年 10 月 Web 開催)
- 29) 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第 49 回 環境変異原学会 (2020 年 9 月、静岡)
- 30) 戸塚ゆ加里 発がん性評価法としての DNA アダクトーム解析の展望 第 37 回 日本毒性病理学会 (2021 年 1 月、Web 開催)
- 31) 戸塚ゆ加里 発がん性評価法としての DNA アダクトーム解析の展望 第 12 回 JBF シンポジウム (2021 年 3 月、Web 開催)
- 32) 鈴木周五、魏民、鰐淵英機。Luteolin によるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果。第 110 回日本病理学会総会、東京 (2021 年 4 月)
- 33) 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智。エラグ酸の膀胱癌抑制効果の検討。第 110 回日本病理学会総会、東京 (2021 年 4 月)
- 34) 山本栄一、高橋祐次、栗形麻樹子、齊藤洋克、松下幸平、豊田武士、佐藤太、北嶋聡、小川久美子、伊豆津健一、斎藤嘉朗、平林容子、飯村康夫、本間正充、奥田晴宏、合田幸広。脱離エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析イメージングによるシクレソニドの 1  $\mu\text{m}$  エアロゾル吸入後のラット肺におけるシクレソニドとその代謝物の空間的局在の可視化。日本薬剤学会第 36 年会、Web 開催 (2021 年 5 月)
- 35) 戸塚ゆ加里。質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析手法 (DNA アダクトーム) の現状と将来展望 第 81 回分析化学討論会、Web 開催 (2021 年 5 月)
- 36) 森川朋美、豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子。ラットを用いたヘム鉄の 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験。日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会、Web 開催 (2021 年 6 月)
- 37) 藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐淵英機。アグリコン型イソフラボンによるホルモン活性が Donryu ラットにおける乳がんおよび子宮内膜がんの発生を促進する。日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会、Web 開催 (2021 年 6 月)
- 38) 梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機。Pueraria mirifica のエストロゲン作用による Donryu ラットにおける乳がんの発生。日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会、Web 開催 (2021 年 6 月)
- 39) 加藤寛之、内木綾。STAT3-DPYD 経路を介した Luteolin の膀胱癌化学予防効果の検討。日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会、Web 開催 (2021 年 6 月)
- 40) 戸塚ゆ加里。DNA 付加体の網羅的解析手法 (DNA アダクトーム) の現状と将来展望 第 144 回日本薬理学会関東支部会、Web 開催 (2021 年 6 月)
- 41) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機。職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 42) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機。遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 43) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。 $\gamma$ -H2AX 免疫染色を用いた芳香族アミンのラット膀胱に対する傷害性および発がん性短期評価手法。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 44) 赤木純一、曹永晚、豊田武士、水田保子、曾根瑞季、小川久美子。肝発がん物質検出のためのバイオマーカーとしての EpCAM および CD13 の有用性検討。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 45) 赤根弘敏、豊田武士、水田保子、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子。内分泌攪乱物質による血中ホルモン値変動と病理組織学的・免疫組織化学的評価。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 46) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シスプラチン誘発急性腎障害から慢性腎臓病への進展における CD44 の発現。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 47) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機。有機ヒ素化合物 DPAA のマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討。2021 年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS)】」若手支援技術講習会、Web 開催 (2021 年 9 月)
- 48) 孫雨晨、齊藤公亮、牛木淳人、安部光洋、齋藤好信、柏田建、堀益靖、弦間昭彦、巽浩一郎、服部登、津島健司、荒川憲昭、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、佐藤元信、高松一彦、森和彦、西矢剛淑、泉高司、大野泰雄、斎藤嘉朗、花岡正幸。メタボローム解析を用いた薬剤性間質性肺炎のバイオマーカー探索。第 65 回日本薬学会関東支部大会、Web 開催 (2021 年 9 月)
- 49) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之。単環芳香族アミン化合物の試験管内反応による二量体形成。がん予防学術大会 2021、Web 開催 (2021 年 9 月)
- 50) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シスプラチン誘発 AKI to CKD モデルラットにおける CD44 の病態生理学的役割。第 164 回日本獣医学会学術集会、Web 開催 (2021 年 9 月)
- 51) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、鰐淵英機。ジフェニルアル

- シン酸のマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年9月)
- 52) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露香料アミン類による膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝物の関係. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
- 53) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
- 54) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
- 55) 豊田武士、赤根弘敏、小川久美子.  $\gamma$ -H2AX 免疫染色によるラット腎発がん物質早期検出法の開発. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
- 56) 赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ラット膀胱発がん物質早期検出における $\gamma$ -H2AX 免疫染色の特異性. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
- 57) 加藤寛之、内木綾、稲熊真悟、小村理行、高橋智. DPYD regulation in pancreatic cancer cell. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
- 58) 戸塚ゆ加里. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
- 59) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. 単環芳香族アミンの遺伝毒性に関わる代謝活性化機構. 環境変異原ゲノム学会第50回記念大会、横須賀 (2021年11月)
- 60) 松下幸平、高須伸二、石井雄二、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. gpt delta ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法による1,3-dichloro-2-propanol の発がん機序の解明. 環境変異原ゲノム学会第50回記念大会、横須賀 (2021年11月)
- 61) 戸塚ゆ加里. 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価. 第50回環境変異原学会、横須賀 (2021年11月)
- 62) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 急性腎障害後に発現するCD44は部分的上皮間葉転換を生じた尿細管において細胞外基質産生を誘導し、慢性腎臓病への移行を促進する. 第4回医薬品毒性機序研究会、Web開催 (2021年12月)
- 63) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響及び尿中代謝物との関係. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
- 64) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 1,4-ジオキサンのin vivo変異原性及び発がん性の定量解析. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
- 65) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、山口貴嗣、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
- 66) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐淵英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
- 67) 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐淵英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤AcetazolamideのWnt/ $\beta$ カテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
- 68) 梯アンナ、鰐淵英機. NAFLD/NASH 肝発がんの促進機序への最近の洞察. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
- 69) 豊田武士、小林琢磨、三好規之、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. オルト-トルイジンおよびオルト-アニシジン代謝物の28日間反復経口投与によるラット膀胱への影響. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022年1月)
- 70) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. F344 ラットを用いたナノサイズ酸化チタン(IV)の28日間反復経口投与毒性試験. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022年1月)
- 71) 赤根弘敏、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子. ラットにおける化学物質誘発抗甲状腺作用検出における病理組織学的及び免疫組織化学的手法と血中ホルモン値との比較. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022年1月)
- 72) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 薬剤性腎障害の慢性化を予測するバイオマーカーとしてのCD44の有用性の検証. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022年1月)
- 73) 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智. 膀胱におけるDPYD発現の寄与と発現抑制機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022年1月)
- 74) 戸塚ゆ加里. ゲノムおよびDNA付加体の網羅的解析により環境因子とがん発生との関連を解明する. 第95回日本薬理学会、福岡 (2022年3月)
- 75) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルに特化した新規in vitro生体模倣評価系の開発. 日本薬学会第142年会、Web開催 (2022年3月)
- 76) 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)
- 77) 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)
- 78) 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)
- 79) 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)
- 80) 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)
- 81) 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)
- 82) 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)
- 83) 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)
- 84) 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)
- 85) 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)
- 86) 豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子.  $\gamma$ -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)
- 87) 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)
- 88) 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)
- 89) 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)
- 90) 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)
- 91) 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)
- 92) 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)
- 93) 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)
- 94) 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)
- 95) Totsuka Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. 13th International Conference on Environmental Mutagens, Ottawa (2022年8月)
- 96) 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)
- 97) 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)
- 98) 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)
- 99) 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)
- 100) 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)

- 101) 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)
- 102) 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)
- 103) 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)
- 104) 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 $\gamma$ -H2AXの役割. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 105) 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)
- 106) 赤木純一、豊田武士、小川久美子.  $\gamma$ -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)
- 107) 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)
- 108) 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)
- 109) 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)
- 110) 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)
- 111) 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)
- 112) 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)
- 113) 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)
- 114) 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)
- 115) 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)
- 116) 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)
- 117) 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)
- 118) 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)
- 119) 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)
- 120) 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)
- 121) 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)
- 122) 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.  $\gamma$ 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)
- 123) 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)
- 124) 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)

- 125) 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)
- 126) Guiyu Qiu、梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. ヒト浸潤性膀胱癌における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)
- 127) 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)
- 128) 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)
- 129) 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)
- 130) 豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子.  $\gamma$ -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)
- 131) 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)
- 132) 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)
- 133) Toyoda T, Yamada T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for  $\gamma$ -H2AX. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023年3月)
- 134) 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)
- 135) 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)
- 136) 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)
- 137) 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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総合分担研究報告書

化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2～4年度に非遺伝毒性肝発がん物21種類と、非発がん物質11種類の合計32種類の化学物質について、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。また、上記の物質とともにOpen TG-GATEに登録されている非遺伝毒性肝発がん物15種類と非肝発がん物質42種類を合わせた合計89種について、従来モデルや新規に開発したモデルでの発がん性検出率について検討した。その結果、従来モデルでは感度39%(14/36)、特異度100%(53/53)、正答率が75%と感度が低いことが確認出来た。そこで新規モデルを開発し、14遺伝子モデルでは、感度56%(20/36)、特異度96%(51/53)と感度の上昇を認めたものの、まだ低いため、高感受性モデルを作成した。その結果、感度が67%(24/36物質)と上昇したものの、特異度83%(44/53)が低下した。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64%(23/36)、特異度94%(50/53)、正答率が82%(73/89)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® Clarion D Assay, Rat (Rat Transcriptome Array 2.0)を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ごとの遺伝子発現変化データを取得した。

得られた遺伝子発現変化のうち、以前にGeneChip® Rat Genome 230 2.0 Arrayを使用して、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた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 $\alpha$ アゴニスト（CFB, WY）に属する化学物質2種において、共通して対照群との発現差がWelch T値が5以上となる遺伝子を選出した。次にそれぞれの属する化学物質において対照群との平均した発現差が4倍以上異なるとともに、42の非発がん物質で発現変動平均が0.5以下となる遺伝子を選出した。加えて、選出した遺伝子が、各所属化学物質の8割以上で変化するとともに、

非発がん物質において2倍以上変化する物質が4つ以下となる遺伝子を選出した(14遺伝子モデル)。

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

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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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2~4年度に、非遺伝毒性肝発がん物質として、Thioacetamide(TAA)、11-Aminoundecanoic acid(AUDA)、di(2-Ethylhexyl)phthalate(DEHP)、Phenobarbital, sodium(PB)、1,4-Dioxane(1,4-D)、Clofibrate(CFB)、Chlorendic acid(CRA)、Ponceau 3R(P3R)、Decabromodiphenyl oxide(DBDPO)、dl-Ethionine(DL-ET)、Doxylamine succinate(DOX)、Methyl carbamate(MCB)、Methyleugenol(MEG)、2-Nitrotoluene(2NT)、N,N-Dimethylformamide(DMF)、Bis(2-ethylhexyl)Phthalate(DEHP)、Poly(hexamethylenebiguanide)hydrochloride(PHMB)、Hexachlorobenzene(HCB)、Wy-14643(WY)、Chlorobenzene(CB)、Furan、Doxylamine succinate(DOX)、Methapyrilene hydrochloride(MP)、Nitrobenzene(NB)、Monuron(MON)、Mirex(MIR)、Safrole(SAF)、Nitrilotriacetic acid(NTA)の27種、非肝発がん物質として、Quercetin dihydrate(QDH)、Phytic acid(PhA)、Cyclohexanone(CHN)、Caprolactam(CPL)、Hexachlorophene(HCP)、Ethylene glycol(EGL)、Terephthalic acid(TPA)、Ethyl acrylate(EAL)、Acrylic acid(ACA)、Triethanolamine(TEA)、Dimethyl terephthalate(DMT)の11種を用いた。このうち、TAA、MP、PB、HCB、CFB、WYについては、Open TG-GATEに登録されているものの、陽性対照として動物実験を行った。また、優先評価物質に属する非遺伝毒性肝発がん物質CB、NB、DMF、DEHP、PHMBの5種および非肝発がん物質であるCHN、CPL、EGL、TPA、EAL、ACA、TEA、DMTの8種を用いている。一部の物質については令和3年度に強制胃内投与や高濃度投与を行い、再検証を行った。令和4年度は、DEHPおよびFuranについては濃度設定を行い、モデルの発がん性判定に対する濃度との関係を検証した。

(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

令和2年度に、マイクロアレイ解析により対照群との遺伝子発現変化を確認し、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた103遺伝子セットを用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出を行った結果、11の非遺伝毒性肝発がん物質うち、TAA、DEHPおよびCFBについては、発がん物質と判定されたものの、他の8物質は陰性と判定された。一方、5つの非発がん物質はいずれも陰性と判定された(表1)。

表1. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果(従来モデル)

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

そこで、新たなモデル開発として、細胞障害(TAA, MP)から4遺伝子、酵素誘導(PB, HCB)から3遺伝子、PPAR $\alpha$ アゴニスト(CFB, WY)から8遺伝子を選出し、酵素誘導とPPAR $\alpha$ アゴニストに共通の遺伝子が1つ存在したことから、合計14遺伝子から構成される14遺伝子モデルを開発した。検討した新規化学物質において感度45%(5/11物質)、特異度100%(5/5)と改善された(表2)。

表2. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果(新規予測モデル)

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



令和3年度に行った動物実験において、従来モデルでは、非遺伝毒性肝発がん物質19物質のうち8物質(42%)が発がん物質として判定された。一方、非発がん物質HCPについては陰性と判定されている。以上より今年度の正答率は45%だった(表3)。

表3. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果(従来モデル)

施設	投与物質	略名	発がん性	令和2年		令和3年	
				投与方法・量	判定	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	陽性	45 mg/kg ig	陽性	○	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	500 mg/kg ig	陰性	×	×
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	1000 mg/kg ig	陰性	×	×
	Methyleugenol	MEG	陽性	250 mg/kg ig	陰性	×	×
香川大	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	300 mg/kg ig	陰性	×	×
	Chlorendic acid	CRA	陽性	5 g/kg diet	陰性	×	×
	N,N-Dimethylformamide	DMF	陽性	10 g/kg diet	陰性	×	×
	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	陽性	50 g/kg diet	陽性	○	○
	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	PHMB	陽性	2 g/kg drink	陰性	×	×
国立衛試	Clofibrate	CF	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○	○
	Hexachlorobenzene	HCB	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○	○
	Wy-14643	WY	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○	○
	Chlorobenzene	CB	陽性	250 mg/kg ig	陰性	×	×
	Furan	Furan	陽性	30 mg/kg ig	陽性	○	○
名市大	dl-Ethionine	DL-ET	陽性	200 mg/kg ig	陰性	×	×
	Doxylamine succinate	DOX	陽性	200 mg/kg ig	陰性	×	×
	Methapyrilene hydrochloride	MP	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○	○
	Nitrobenzene	NB	陽性	125 mg/kg ig	陰性	×	×
	Hexachlorophene	HCP	陰性	20 mg/kg ig	陰性	○	○

一方、14 遺伝子モデルを用いた解析における非遺伝毒性肝発がん物質の検出を行った結果を表4に示す。遺伝毒性肝発がん物質19物質のうち12物質(63%)が発がん物質として判定された。非発がん物質HCPについては陰性と判定されている。以上より正答率は65%だった。

表4. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果(14 遺伝子モデル)

施設	投与物質	略名	発がん性	令和2年		令和3年	
				投与方法・量	判定	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	陽性	45 mg/kg ig	陽性	○	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	500 mg/kg ig	陰性	×	×
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	1000 mg/kg ig	陰性	×	×
	Methyleugenol	MEG	陽性	250 mg/kg ig	陽性	○	○
香川大	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○	○
	Chlorendic acid	CRA	陽性	5 g/kg diet	陽性	○	○
	N,N-Dimethylformamide	DMF	陽性	5 g/kg diet	陰性	×	×
	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	陽性	50 g/kg diet	陽性	○	○
	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	PHMB	陽性	2 g/kg drink	陰性	×	×
国立衛試	Clofibrate	CF	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○	○
	Hexachlorobenzene	HCB	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○	○
	Wy-14643	WY	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○	○
	Chlorobenzene	CB	陽性	250 mg/kg ig	陰性	×	×
	Furan	Furan	陽性	30 mg/kg ig	陽性	○	○
名市大	dl-Ethionine	DL-ET	陽性	200 mg/kg ig	陰性	×	×
	Doxylamine succinate	DOX	陽性	200 mg/kg ig	陽性	○	○
	Methapyrilene hydrochloride	MP	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○	○
	Nitrobenzene	NB	陽性	125 mg/kg ig	陰性	×	×
	Hexachlorophene	HCP	陰性	20 mg/kg ig	陰性	○	○

また、令和2年度の非遺伝毒性発がん物質の一部について、令和3年度は、投与方法を強制胃内投与に変更した結果、従来モデルおよび14遺伝子モデルいずれも1物質陽性判定が増え、感度は上昇したものの大きく改善はされなかった(表5、6)。

表5. 投与方法および投与濃度変更による発がん性判定結果(従来モデル)

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

表6. 投与方法および投与濃度変更による発がん性判定結果(14遺伝子モデル)

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

そこで、より感度を改善するため、高感受性モデルを開発し検討した結果、非遺伝毒性肝発がん物質19物質のうち16物質(84%)が発がん物質として判定された。一方、非発がん物質HCPについては陽性と判定されている。以上より今年度の正答率は80%だった(表7)。

表7. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果(高感受性モデル)

施設	投与物質	略名	発がん性	令和2年		令和3年	
				投与方法・量	判定	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	陽性	45 mg/kg ig	陽性	○	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	500 mg/kg ig	陽性	○	○
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	1000 mg/kg ig	陽性	○	○
	Methyleugenol	MEG	陽性	250 mg/kg ig	陽性	○	○
香川大	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○	○
	Chlorendic acid	CRA	陽性	5 g/kg diet	陽性	○	○
	N,N-Dimethylformamide	DMF	陽性	5 g/kg diet	陰性	×	×
	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	陽性	50 g/kg diet	陽性	○	○
	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	PHMB	陽性	2 g/kg drink	陰性	×	×
国立衛試	Clofibrate	CF	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○	○
	Hexachlorobenzene	HCB	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○	○
	Wy-14643	WY	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○	○
	Chlorobenzene	CB	陽性	250 mg/kg ig	陽性	○	○
	Furan	Furan	陽性	30 mg/kg ig	陽性	○	○
名市大	dl-Ethionine	DL-ET	陽性	200 mg/kg ig	陽性	○	○
	Doxylamine succinate	DOX	陽性	200 mg/kg ig	陽性	○	○
	Methapyrilene hydrochloride	MP	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○	○
	Nitrobenzene	NB	陽性	125 mg/kg ig	陰性	×	×
	Hexachlorophene	HCP	陰性	20 mg/kg ig	陽性	×	×

令和4年度に動物実験を行った物質について、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%)が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8)。

表8. 既存の非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果

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	○
Saflrole	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、PPARα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 $\alpha$  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 9)。

表 9. 機序別統合モデルによる非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果

予測モデル	Low-Doseモデル			LowDoseモデル Total
	Cytotoxicants	Enzyme inducers	PPAR $\alpha$ agonists	
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10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10. 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11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11. 機序別統合モデルにおける89物質の成績

各予測モデル	Cytotoxicants	Enzyme inducers	PPAR $\alpha$ agonists	Total
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12)。

表12. 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	x	x	○	○	○	○
14遺伝子モデル	x	x	○	○	○	○
高感受性モデル	○	○	○	○	○	○
機序別統合モデル	x	x	○	○	○	○

#### 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。また、強制胃内投与に変更した結果、感度の改善は限定的だった。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て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.  $\sigma$ -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-kappaB- 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.
  - 10) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett*. 2021; 336: 32-8.
  - 11) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2021; 13: 1216.
  - 12) Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2021; 13: 3613.
  - 13) Kawata K, Baba A, Shiota M, Wanibuchi H, Baba Y. ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *J Biochem*. 2021; 170: 483-8.
  - 14) Mori T, Tanaka H, Suzuki S, Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer. *Cancer Sci*. 2021; 112: 1746-57.
  - 15) Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2021; 259: 3127-36.
  - 16) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2020; 96: 180-7.
  - 17) Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani T. Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-resistant bladder cancer. *Cancer Lett*. 2020; 479: 89-99.
  - 18) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol*. 2020; 33: 279-85.
  - 19) Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the association with prognosis and treatment. *PLoS One*. 2020; 15: e0238120.
  - 20) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2020; 21.
  - 21) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol*. 2020; 94: 927-37.
2. 学会発表
    - 1) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミンacetoaceto-*o*-toluidideのラット膀胱発がん性とその機序解明. 第93回産業衛生学会、Web開催 (2020年4月)
    - 2) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発

- がん促進作用. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催 (2020 年 6 月)
- 3) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase阻害剤apocyninによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第109回日本病理学会総会、Web開催 (2020年8月)
  - 4) 鰐淵英機、魏民. 職業曝露によるがん発生の要因解明と予防研究への展開. 第 27 回がん予防学会総会. Web 開催 (2020 年 9 月)
  - 5) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. ラット膀胱尿路上皮のニコチンによる増殖はNADPH oxidase阻害剤apocyninにより抑制される. 第79回日本癌学会学術総会、Web開催 (2020年10月)
  - 6) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020 年 10 月)
  - 7) 鰐淵英機. 日本毒性病理学会のグローバル戦略. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
  - 8) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
  - 9) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
  - 10) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2 の解明. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
  - 11) 鈴木周五、魏民、鰐淵英機. Luteolinによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第110回日本病理学会総会、東京 (2021年4月)
  - 12) 藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐淵英機. アグリコン型イソフラボンによるホルモン活性がDonryuラットにおける乳がんおよび子宮内膜がんの発生を促進する. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催 (2021年6月)
  - 13) 梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. Pueraria mirificaのエストロゲン作用によるDonryuラットにおける乳がんの発生. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催 (2021年6月)
  - 14) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年7月)
  - 15) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年7月)
  - 16) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 2021年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS)】」若手支援技術講習会、Web開催 (2021年9月)
  - 17) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露香族アミン類による膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝物の関係. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 18) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 19) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 20) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、鰐淵英機. ジフェニルアルシンのマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年9月)
  - 21) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響及び尿中代謝物との関係. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 22) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 1,4-ジオキサンの *in vivo*変異原性及び発がん性の定量解析. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 23) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、山口貴嗣、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 24) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐淵英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 25) 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐淵英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤AcetazolamideのWnt/ $\beta$ カテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 26) 梯アンナ、鰐淵英機. NAFLD/NASH 肝発がんの促進機序への最近の洞察. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 27) 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)
  - 28) 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)

- 29) 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)
- 30) 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)
- 31) 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)
- 32) 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)
- 33) 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)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) 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)
- 37) 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)
- 38) 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)
- 39) 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)
- 40) 藤岡正喜、魏民、Vachiraarunwong 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)
- 41) 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)
- 42) 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)
- 43) 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.  $\gamma$ 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)
- 44) 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)
- 45) 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)
- 46) 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)
- 47) 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)
- 48) 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)
- 49) 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)
- 50) 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

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 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2～4年度にかけて、非遺伝毒性肝発がん物質12種および非肝発がん物質3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、従来の予測モデルで5物質が、14遺伝子モデルで7物質が、高感受性モデルでは10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値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合計12種：Thioacetamide (TAA; 0.5 g/kg)、11-Aminoundecanoic acid (AUDA; 15 g/kg)、di(2-Ethylhexyl)phthalate (DEHP; 12 g/kg)、Monuron (MON; 0.3%)、Mirex (MIR; 100 mg/kg)、およびSafrole (SAF; 1%→0.5%)を混餌投与した。また、Thioacetamide (TAA; 45 mg/kg)、Phenobarbital, sodium (PB; 100 mg/kg)、Methyl carbamate (MCB; 500 mg/kg)、1,4-Dioxane (1,4-D; 1000 mg/kg)、Methyleugenol (MEG; 250 mg/kg)、2-Nitrotoluene (2NT; 300 mg/kg)を強制胃内投与した。非肝発がん物質3種：Quercetin dihydrate (QDH; 50 g/kg)、優先評価物質に属するEthylene glycol (EGL; 4%)および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

令和2年度の実験経過中にTAA投与群において、対照群に比べ摂餌量が少なく体重増加抑制傾向が見られ、最終屠殺時には対照群に比べ有意な体重減少を認めた(表1)。また、DEHP投与群においては肝臓の絶対および相対重量いずれも対照群に比べ有意な増加を認めた(表1)。一方、AUDA群やQDH群において、体重や肝重量、摂餌・飲水量に対照群との差は見られなかった(表1)。

表1. 体重および肝重量、摂餌・飲水量

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

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

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

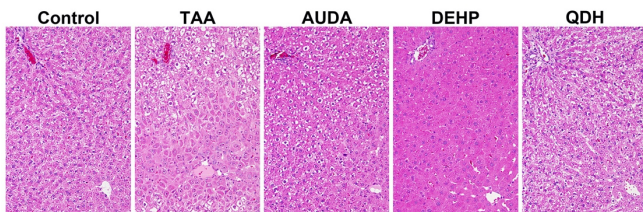


図1. 各物質を投与したラット肝組織像

令和3年度の実験経過中にTAA、MCBおよび2NT投与群において、対照群に比べ体重増加抑制傾向が見られ、最終屠殺時には対照群に比べ有意な体重減少を認めた(表2)。また、TAA、PB、1,4-Dおよび2NT投与群においては肝臓相対重量が対照群に比べ有意な増加を認めた(表2)。

表2. 体重および肝重量、摂餌・飲水量

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

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

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

った(図2)。

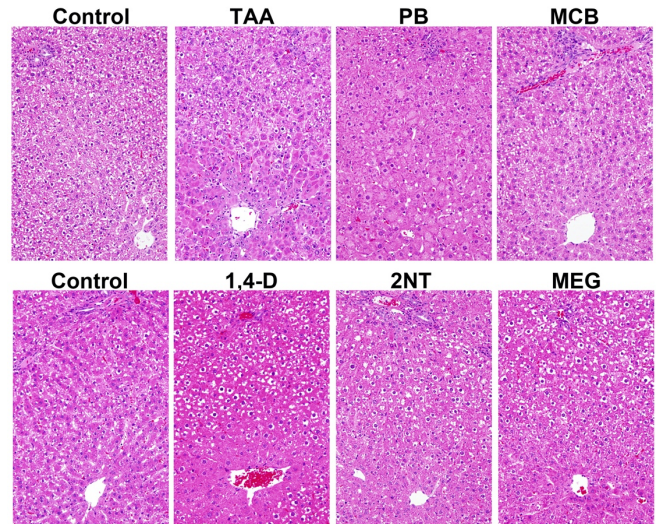


図2. 各物質を投与したラット肝組織像

令和4年度の実験開始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3)。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3)。

表3. 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: Salfrole; EGL: Ethylene glycol; TPA: Terephthalic acid

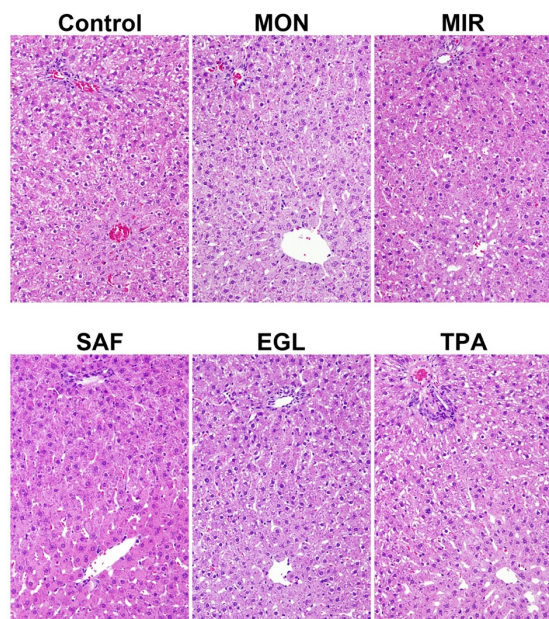


図3. 各物質を投与したラット肝組織像

肝臓の組織学的検討した結果、MIR投与群でZone 3に

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3）。

令和2～4年度に行った実験の各肝組織からRNAを抽出した結果、いずれもA260/A280が平均2以上と良い状態だった。マイクロアレイ解析を行った結果、混餌投与群において対照群に対してZ scoreが2倍以上、発現差が1.5倍以上変動した遺伝子は、TAA投与群においては上昇475、低下390、AUDA投与群では上昇132、低下240、DEHP投与群では上昇313低下239、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、QDH投与群では上昇191、低下157、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。強制胃内投与群において、対照群に対してZ scoreが2.0倍以上、発現差が1.5倍以上変動した遺伝子は、TAA投与群においては上昇535、低下687、PB投与群では上昇457、低下447、MCB投与群では上昇539、低下530、1,4-D投与群では上昇528、低下460、2NT投与群では上昇442、低下579、MEG投与群では上昇358、低下605の遺伝子を認めた。

各投与群における遺伝子発現データについて、構築済の非遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、非遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った結果を表4に示す。従来の予測モデルで5物質が、14遺伝子モデルで7物質が、高感受性モデルでは10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。

表4. 各物質における発がん性判定結果

年度 投与法	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
令和2年 混餌	Thioacetamide	TAA	陽性	陽性	○	陽性	○	陽性	○
	di(2-Ethylhexyl)phthalate	DEHP	陽性	陰性	×	陰性	×	陰性	×
	11-Aminoundecanoic acid	AUDA	陽性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
	Quercetin dihydrate	QDH	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
令和3年 胃内投与	Thioacetamide	TAA	陽性	陽性	○	陽性	○	陽性	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	陽性	○	陽性	○	陽性	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	陰性	×	陰性	×	陽性	○
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	陰性	×	陰性	×	陽性	○
	Methyleugenol	MEG	陽性	陰性	×	陰性	○	陽性	○
令和4年 混餌	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	陰性	×	陽性	○	陰性	○
	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	○
	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、いずれのモデルにおいても、がん物質として同定できたTAA、DEHP、PB、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。令和2年度に混餌投与で陰性となったPBが令和3年に行った強制胃内投与方法により陽性となったことから、投与濃度および投与方法について検討する必要がある。

2NTやMEGは従来の予測モデルでは陰性と判定されたものの、14遺伝子モデルにおいて陽性と判定されており、従来モデルよりも高い感度を示した。しかしながら、MCBや1,4-Dはいずれも陰性と判定された。そこで開発された高感受性モデルはいずれも陽性となり、感度の高いモデルであることが示された。一方で、非肝発がん物質3つについて従来モデルや14遺伝子モデルでは、全て陰性と判定されたものの、高感受性モデルでは1物質陽性と判定され、特異度の低下が見られた。感度および特異度いずれもより高いモデルの開発が望まれる。

#### 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) 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.
- 4) Saleh DM, Luo S, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Gunasekaran S, El-Gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohnishi M, Tomono S, Hady R, Fukamachi K, Kanno J, Hirose A, Xu J, Suzuki S, Naiki-Ito A, Takahashi S, Tsuda H. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. Part Fibre Toxicol. 2022; 19: 30.
- 5) 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) 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.
- 7) 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.
- 8) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL,



- Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 2021; 336: 32-8.
- 9) Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H. Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability. *Cell Rep.* 2021; 37: 109988.
  - 10) Mori T, Tanaka H, Suzuki S, Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2021; 112: 1746-57.
  - 11) Kato H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* 2021; 42: 940-50.
  - 12) Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 3613.
  - 13) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 1216.
  - 14) Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, Suzuki S, Yabata H, Koizumi R, Moriyoshi H, Yazawa I. Selective extension of cerebral vascular calcification in an autopsy case of Fahr's syndrome associated with asymptomatic hypoparathyroidism. *Neuropathology.* 2021; 41: 387-95.
  - 15) Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 2020; 12: 558.
  - 16) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
  - 17) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. *Toxicology.* 2020; 429: 152325.
  - 18) Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2020; 41: 1145-57.
  - 19) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 4085-97.
  - 20) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a curcumin analog, as a potential anti-prostate cancer inhibitor in vitro and in vivo. *Molecules.* 2020; 25: 2737.
  - 21) Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Toyama T, Takahashi S. The standard form of CD44 as a marker for invasion of encapsulated papillary carcinoma of the breast. *Pathol Int.* 2020; 70: 835-43.
  - 22) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 7746.
  - 23) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagai T, Etani T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway. *Cancer Sci.* 2020; 111: 1165-79.
  - 24) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 927-37.
2. 学会発表
    - 1) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase阻害剤apocyninによるニコチン誘

- 発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第109回日本病理学会総会、Web開催 (2020年8月)
- 2) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. ラット膀胱尿路上皮のニコチンによる増殖はNADPH oxidase阻害剤apocyninにより抑制される. 第79回日本癌学会学術総会、Web開催 (2020年10月)
  - 3) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明. 第 93 回産業衛生学会、Web 開催 (2020 年 4 月)
  - 4) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催 (2020 年 6 月)
  - 5) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020 年 10 月)
  - 6) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、山下依子、稲熊真悟、高橋 智. LuteolinはSTAT3経路とDPD発現を低下させ膀胱癌を抑制する. 第109回日本病理学会総会、福岡 (2020年4月)
  - 7) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2020 年 1 月)
  - 8) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
  - 9) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2 の解明. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
  - 10) 鈴木周五、魏民、鰐淵英機. Luteolinによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第110回日本病理学会総会、東京 (2021年4月)
  - 11) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年7月)
  - 12) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年7月)
  - 13) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 2021年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS)】」若手支援技術講習会、Web開催 (2021年9月)
  - 14) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、鰐淵英機. ジフェニルアルシ
  - ン酸のマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年9月)
  - 15) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露芳香族アミン類による膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝物の関係. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 16) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 17) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 18) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響及び尿中代謝物との関係. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 19) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 1,4-ジオキサンの *in vivo*変異原性及び発がん性の定量解析. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 20) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、山口貴嗣、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 21) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐淵英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 22) 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐淵英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤AcetazolamideのWnt/ $\beta$ カテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
  - 23) 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)
  - 24) 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)
  - 25) 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)
  - 26) 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)
  - 27) 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)

- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) 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)
- 31) 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)
- 32) 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)
- 33) 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)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) 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)
- 37) 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)
- 38) 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)
- 39) 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)
- 40) 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)
- 41) 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)
- 42) 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)
- 43) 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  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総合研究報告書

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

令和 2～4 年度にかけて、6 週齢の雄 SD ラットに非遺伝毒性肝発がん物質 7 種：0.125% Chlorendic acid、5% Ponceau 3R、300 mg/kg Clofibrate、300 mg/kg Hexachlorobenzene、100 mg/kg Pirinixic acid、250 mg/kg Chlorobenzene および 30 mg/kg Furan、ならびに肝臓に発がん性を示さない物質として 0.75% Caprolactam および 200 mg/kg Ethyl acrylate を 28 日間反復経口投与した。また、用量相関性を検討するため、Furan を 0, 3, 10 および 30 mg/kg の用量で同様に 28 日間反復経口投与した。投与期間終了時に解剖し、肝臓の病理組織学的検索および遺伝子発現解析用の RNA 抽出を行った。病理組織学的検索の結果、肝発がん物質は肝細胞肥大等、それぞれ特徴的な肝病変を誘発することが示された。また、Furan によ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。

## 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ることを目指した。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」を確立するため、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を図った。

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標として研究を実施した。

## B. 研究方法

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

【令和 3 年度】非遺伝毒性肝発がん物質 5 種：Clofibrate (CFB), Hexachlorobenzene (HCB), Pirinixic acid (Wy-14643), Chlorobenzene (CB) および Furan を、6 週齢の雄 SD ラットに、溶媒（コーン油）対照群とともに 28 日間強制経口投与した（各群 5 匹）。被験物質の中で、HCB は化審法に定める第一種特定化学物質、CB は優先評価化学物質にそれぞれ指定されている。各物質の投与濃度は短期試験における最大耐量として、300 mg/kg CFB, 300 mg/kg HCB, 100 mg/kg Wy-14643, 250 mg/kg CB および 30 mg/kg Furan に設定した。

【令和 4 年度】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（各群 5 匹）。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。

各年度とも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

【令和 2 年度】対照群および各被験物質投与群の、体重・摂餌/飲水量・被験物質摂取量を表 1 に示す。CFB・CPL 投与群では体重増加量の抑制傾向が認められたものの、統計学的有意差はみられなかった。

各群の肝および腎重量を表 2 に示す。CRA 投与群では肝相対重量の低下、CI16155・CFB 投与群では肝絶対・相対重量の増加、CFB・CPL 投与群では腎相対重量の増加がそれぞれ認められた。

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

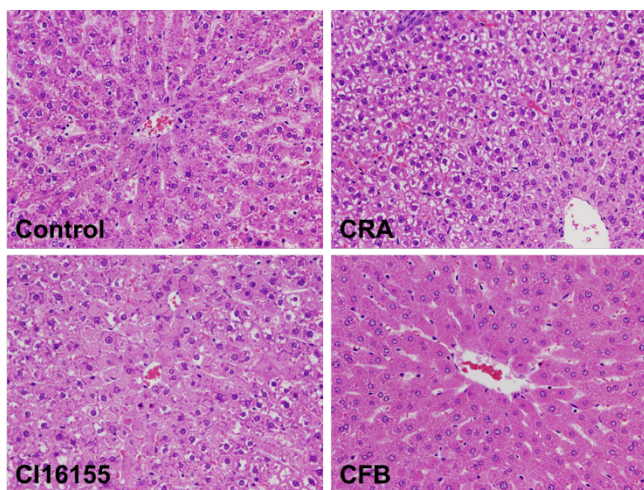


図 1. 肝臓における病理組織学的変化 (令和 2 年度)

表 1. 各投与群における体重・摂餌量・飲水量 (令和 2 年度)

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

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

表 2. 各投与群における肝および腎重量 (令和 2 年度)

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

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

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

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

各群の肝および腎重量を表 4 に示す。CFB・HCB・Wy-14643・Furan 投与群では肝絶対/相対重量の増加、CB 投与群では肝相対重量の増加、HCB 投与群では腎絶対/相対重量の増加、CFB・Wy-14643・CB・Furan 投与群では腎相対重量の増加がそれぞれ認められた。

肝臓の病理組織学的検索の結果、CFB・Wy-14643 投与群では細胞質の好酸性顆粒状変化を伴う肝細胞肥大が、CFB 投与群では小葉中心性、Wy-14643 投与群ではび慢性に認められた (図 2)。HCB・CB 投与群においても小葉中心性肝細胞肥大が認められ、細胞質はそれぞれ好酸性、あるいは淡明なすりガラス状を呈した。Wy-14643 投与群にはこれに加えて、小葉辺縁部における胆管過形成も観察された。Furan 投与群では、肝細胞の変性および壊死、核の大型化がび慢性にみられたほか、胆管線維症および oval cell の過形成が、特に尾状葉において顕著に認められた。

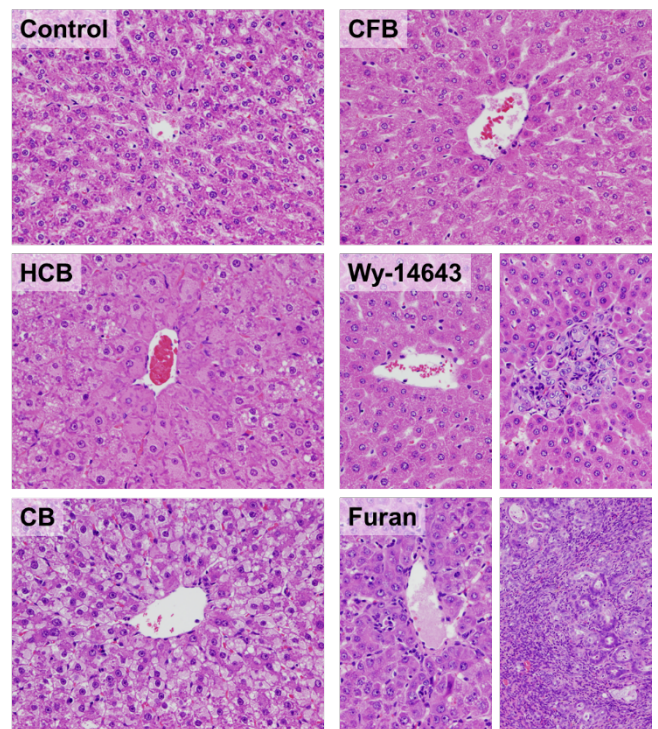


図 2. 肝臓における病理組織学的変化 (令和 3 年度)

表 3. 各投与群における体重・摂餌量・飲水量 (令和 3 年度)

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

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

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

表 4. 各投与群における肝および腎重量 (令和 3 年度)

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

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

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

【令和 4 年度】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 5 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 6 に示す。Furan 投与群では用量依存的な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。

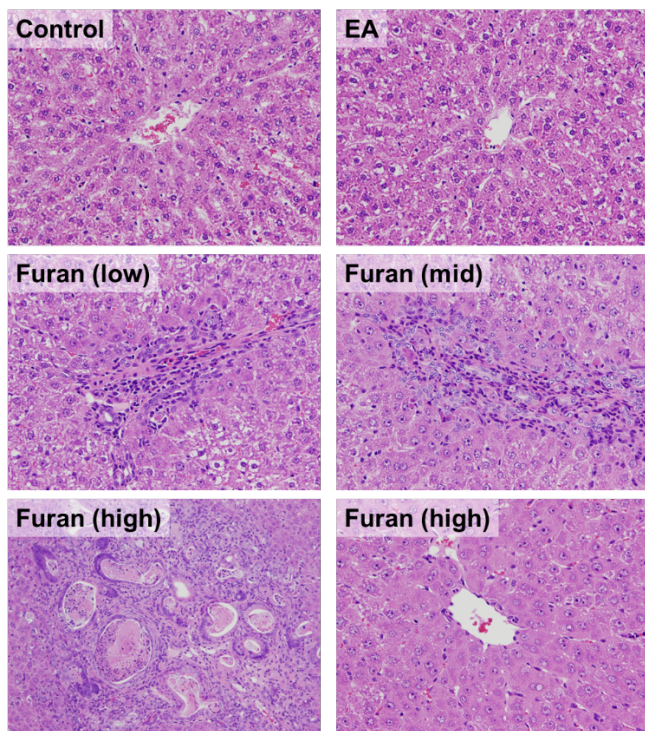


図 3. 肝臓における病理組織学的変化 (令和 4 年度)

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 3 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、肝細胞のび慢性肥大および核の大型化 (図 3 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 3 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 3 上段)。

表 5. 各投与群における体重・摂餌量・飲水量 (令和 4 年度)

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 6. 各投与群における肝および腎重量 (令和 4 年度)

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).

## D. 考察

令和 2~4 年度にかけて、6 週齢の雄 SD ラットに対し、非遺伝毒性肝発がん物質 7 種および非肝発がん物質 2 種を 28 日間反復経口投与した。

高脂血症治療薬である CFB は PPAR $\alpha$  活性化を介してペルオキシソームを増加させ、組織学的に好酸性顆粒状の肝細胞肥大を誘発することが知られている。染色液として使用される CI16155 の肝毒性/発がん機序は未解明であるが、本研究で認められたすりガラス状肝細胞肥大は、酵素誘導を介した滑面小胞体の増加が起きている可能性を示唆する。CRA は主に難燃剤・樹脂原料として利用され、以前に実施された 13 週間反復経口投与試験 (NTP, 1987) において、高用量 (0.5%以上) では肝細胞肥大・異型分裂像・胆管増生の誘導が報告されている。比較的低い用量 (0.125%) を用いた本研究ではこれらの病変は認められず、ごく軽微な空胞変性を示すにとどまった。CPL はナイロン原料として汎用され、IARC による発がん性評価において唯一、Group 4「ヒトに対する発がん性がおそくない」に分類されていた物質である (現在は Group 3 に統合)。本研究においても、肝臓に対する影響は認められなかった。

Wy-14643 は高脂血症治療薬として利用され、CFB と同様に PPAR $\alpha$  活性化を介した好酸性顆粒状の肝細胞肥大を誘発することが知られている。HCB はかつて農薬 (殺菌剤) や工業的用途に用いられたが、現在は第一種特定化学物質に指定され、流通は限定的である。ラットに対し滑面小胞体の増加を誘導することが報告されており、本研究で認められた好酸性すりガラス状の肝細胞肥大が該当する所見と考えられた。CB は合成中間体や有機溶媒として汎用され、優先評価化学物質に指定されている。ほとんどの遺伝毒性試験に陰性を示し、非遺伝毒性肝発がん物質とされているが、がん原性試験における雄 F344 ラットでの肝腫瘍発生率は 16% (8/49) と、対照群 (8%, 8/100) と比較してわずかな増加にとどまる (NTP, 1985)。Furan は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)。発がん機序として、代謝物 (シス-2-ブテン-1, 4-ジアルデヒド) を介した遺伝毒性の関与も疑われている (JECFA, 2011)。本研究において、Furan はラット肝臓に種々の病理組織学的所見を誘発し、その程度は明確な用量相関性を示すことが明らかとなった。

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。CPL 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。

各被験物質投与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 2~4 年度にかけて、非遺伝毒性肝発がん物質 7 種および非肝発がん物質 2 種について、ラットを用いた 28 日間反復経口投与を実施し、肝臓の病理組織学的検索および遺伝子発現解析用の RNA 抽出を行った。病理組織学的検索の結果、肝発がん物質は肝細胞肥大等、それぞれ特徴的な肝病変を誘発することが示された。また、Furan によ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。

## 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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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.
- 8) 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: 1603-17.
- 9) Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, [Toyoda T](#), Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharm.* 2021; 595: 120241.
- 10) Yamada T, [Toyoda T](#), Matsushita K, Cho YM, Akagi JI, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K. Expression of stem cell markers as useful complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for  $\gamma$ -H2AX. *Arch Toxicol.* 2021; 95: 715-26.
- 11) Yamada T, [Toyoda T](#), Ide T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Neuromuscular and vascular hamartoma of the small intestine in an F344 rat. *J Toxicol Pathol.* 2021; 34: 113-7.

- 12) Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-(1-menthoxy)ethanol in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2021; 34: 309-17.
- 13) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Specific expression of survivin, SOX9, and CD44 in renal tubules in adaptive and maladaptive repair processes after acute kidney injury in rats. *J Appl Toxicol.* 2021; 41: 607-17.
- 14) Matsushita K, Takasu S, Ishii Y, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. In vivo mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of gpt delta rats. *Arch Toxicol.* 2021; 95: 3117-31.
- 15) Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N(4)-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 2021; 34: 912-9.
- 16) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 2020; 33: 1907-14.
- 17) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
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  $\gamma$ -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.  $\gamma$ -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 $\gamma$ -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.  $\gamma$ -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.  $\gamma$ -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)
  - 27) 豊田武士、小林琢磨、三好規之、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. オルト-トルイジンおよびオルト-アニシジン代謝物の 28 日間反復経口投与によるラット膀胱への影響. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022 年 1 月)
  - 28) 豊田武士、赤根弘敏、小川久美子.  $\gamma$ -H2AX 免疫染色によるラット腎臓がん物質早期検出法の開発. 第 80 回日本癌学会学術総会、横浜 (2021 年 10 月)
  - 29) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子.  $\gamma$ -H2AX 免疫染色を用いた芳香族アミンのラット膀胱に対する傷害性および発がん性短期評価手法. 第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
  - 30) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. F344 ラットを用いたナノサイズ酸化チタン (IV) の 28 日間反復経口投与毒性試験. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022 年 1 月)
  - 31) 赤根弘敏、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子. ラットにおける化学物質誘発抗甲状腺作用検出における病理組織学的及び免疫組織化学的手法と血中ホルモン値との比較. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022 年 1 月)
  - 32) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 薬剤性腎障害の慢性化を予測するバイオマーカーとしての CD44 の有用性の検証. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022 年 1 月)
  - 33) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 急性腎障害後に発現する CD44 は部分的上皮間葉転換を生じた尿細管において細胞外基質産生を誘導し、慢性腎臓病への移行を促進する. 第 4 回医薬品毒性機序研究会、Web 開催 (2021 年 12 月)
  - 34) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆかり、若林敬二、三好規之. 単環芳香族アミンの遺伝毒性に関わる代謝活性化機構. 環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、横須賀 (2021 年 11 月)
  - 35) 松下幸平、高須伸二、石井雄二、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. *gpt delta* ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法による 1,3-dichloro-2-propanol の発がん機序の解明. 環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、横須賀 (2021 年 11 月)
  - 36) 赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ラット膀胱発がん物質早期検出における  $\gamma$ -H2AX 免疫染色の特異性. 第 80 回日本癌学会学術総会、横浜 (2021 年 10 月)

- 37) 孫雨晨、齊藤公亮、牛木淳人、安部光洋、齋藤好信、柏田建、堀益靖、弦間昭彦、巽浩一郎、服部登、津島健司、荒川憲昭、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、佐藤元信、高松一彦、森和彦、西矢剛淑、泉高司、大野泰雄、齋藤嘉朗、花岡正幸。メタボローム解析を用いた薬剤性間質性肺炎のバイオマーカー探索。第65回日本薬学会関東支部大会、Web開催(2021年9月)
- 38) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之。単環芳香族アミン化合物の試験管内反応による二量体形成。がん予防学術大会2021、Web開催(2021年9月)
- 39) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シスプラチン誘発 AKI to CKD モデルラットにおける CD44 の病態生理学的役割。第164回日本獣医学会学術集会、Web開催(2021年9月)
- 40) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、曾根瑞季、小川久美子。肝発がん物質検出のためのバイオマーカーとしての EpCAM および CD13 の有用性検討。第48回日本毒性学会学術年会、神戸(2021年7月)
- 41) 赤根弘敏、豊田武士、水田保子、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子。内分泌攪乱物質による血中ホルモン値変動と病理組織学的・免疫組織化学的評価。第48回日本毒性学会学術年会、神戸(2021年7月)
- 42) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シスプラチン誘発急性腎障害から慢性腎臓病への進展における CD44 の発現。第48回日本毒性学会学術年会、神戸(2021年7月)
- 43) 森川朋美、豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子。ラットを用いたヘム鉄の90日間亜慢性反復経口投与毒性試験。日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催(2021年6月)
- 44) 山本栄一、高橋祐次、栗形麻樹子、齊藤洋克、松下幸平、豊田武士、佐藤太、北嶋聡、小川久美子、伊豆津健一、齋藤嘉朗、平林容子、飯村康夫、本間正充、奥田晴宏、合田幸広。脱離エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析イメージングによるシクレソニドの1 $\mu$ mエアロゾル吸入後のラット肺におけるシクレソニドとその代謝物の空間的局在の可視化。日本薬剤学会第36年会、徳島(2021年5月)
- 45) 豊田武士、松下幸平、山田貴宣、赤木純一、森川朋美、小川久美子。腎発がん物質早期検出指標としての $\gamma$ -H2AXの応用可能性:用量相関性の検討。第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催(2021年1月)
- 46) 豊田武士、小川久美子。ラット膀胱粘膜における $\gamma$ -H2AX形成を指標とした芳香族アミンの膀胱傷害性および発がん性評価。第79回日本癌学会学術総会、広島(2020年10月)
- 47) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子。オルト-トルイジン類似構造を持つ芳香族アミンによるラット膀胱傷害および遺伝子発現解析。第47回日本毒性学会学術年会、Web開催(2020年6月)
- 48) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、井手鉄哉、小川久美子。ラット肝臓標本を用いた肝発がん物質早期検出のためのバイオマーカーの探索。第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催(2021年1月)
- 49) 山田貴宣、原田賢吾、豊田武士、小川久美子、中山千里、田川義章、奥山学。SDラットに認められた真正半陰陽の一例。第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催(2021年1月)
- 50) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子。急性腎障害から慢性腎臓病への進展におけるCD44の役割。第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催(2021年1月)
- 51) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之。*o*-Anisidine曝露ラット尿中代謝物の探索。日本環境変異原学会第49回大会、沼津(2020年11月)
- 52) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、靄島由二。RNAアプタマーを利用した組織再生を促進する新規機能性医用材料の創製に関する研究。第58回日本人工臓器学会大会、高知(2020年11月)
- 53) 赤木純一、豊田武士、小川久美子。肝発がん物質投与ラット肝細胞における $\gamma$ -H2AX誘導と細胞増殖活性の相関。第79回日本癌学会学術総会、広島(2020年10月)
- 54) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之。*o*-Anisidine曝露ラット尿中代謝物の探索。がん予防学術大会2020、Web開催(2020年9月)
- 55) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子。腎虚血再灌流障害モデルラットを用いた急性腎障害から慢性腎臓病への進展メカニズムの解明。第163回日本獣医学会学術集会、Web開催(2020年9月)
- 56) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子。mRNA-microRNA統合解析を用いた腎代償性メカニズムの包括的解析。第47回日本毒性学会学術年会、Web開催(2020年6月)

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

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

分担研究項目：遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立

研究分担者 横平 政直 香川大学医学部医学教育学 教授

## 研究要旨

遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力を検証するため検討を行った。多種の遺伝毒性肝発がん物質、非肝発がん物質、及び非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、24時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。その結果、遺伝子セットを用いた判定の結果、令和2年度では、Phytic\_acid や Cyclohexanone については、陰性であり予想通りとなったが、positive control である、Phenobarbitalが発癌物質として検出されなかった。令和3年度は、Bis(2-ethylhexyl) Phthalateのみ陽性であり、その他の3物質は肝発がん物質であるが検出できなかった。令和4年度では、3物質のいずれも結果は陰性であり予想通りとなった。本モデルは未知の物質に対して肝発がん予測に有用な情報を与えること期待されるが、その検出限界に注意が必要である。

## A. 研究目的

生活環境を取り巻く化学物質の発がん性を迅速にかつ高精度に検証できるシステムの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、システムで得られた結果は国民生活の安全・安心を保証する。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、確立する必要性がある。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癌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。

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

## B. 研究方法

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

屠殺剖検を行い肝臓を採取した。肝臓からRNeasy mini kit（キアゲン）を用いてtotal RNAを抽出・精製し、microarrayを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ごとの遺伝子発現変化データを取得した。得られた遺伝子発現変化のうち、以前に非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた106遺伝子セットを用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出（サポートベクターマシンの数論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。

香川大担当分として、令和2年度は、非遺伝毒性肝発がん物質2種：Phenobarbital, sodium (500 mg/L)、1,4-Dioxane (5 g/L) と、非肝発がん物質2種：Phytic acid (2.5%)、Cyclohexanone (6.5 g/L) を飲水投与し検討を行った。令和3年度は、Chlorendic acid (5 g/kg)、N,N-Dimethylformamide (5 g/kg)、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (50 g/kg) を混餌投与、Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride (2 g/kg) を飲水投与し検討を行った。令和4年度は、非肝発がん物質3種：Nitrilotriacetic acid (0.1%)、Acrylic acid (0.5%)、Triethanolamine (2%) を飲水投与し検討を行った（表1）。

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4匹から得たRNAをそれぞれ同一量混ぜて、一つのサンプルとした。アレイ解析は株式会社セルイノベーターに受託した。

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

#### (倫理面の配慮)

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

### C. 研究結果

全研究期間の結果を表1に示す。令和2年度について、Phytic acid群において実験開始1週目から有意な飲水量および摂餌量の低下が見られ、2週目から有意な体重減少を認めた。また、実験27日目にPhytic acid群の2匹が死亡した。このため、1群4匹から得たRNAをそれぞれ同一量混ぜて、一つのサンプルとする予定であったが、この群のみ2匹分のRNAによりアレイ解析を行った。Phenobarbital, sodium群およびPhytic acid群について有意な体重減少を認めた。また、肝重量について、Cyclohexane群では絶対重量および相対重量のいずれも有意な増加を認めた。Phytic acid群では絶対重量の有意な低下が見られた。肉眼所見および病理組織所見では、いずれの群もControl群と比べて、肝臓に明らかな変化は認められなかった。アレイ解析の結果を肝発がん性予測モデルに入力したところ、今回検討した4物質のいずれも陰性の結果であった。

令和3年度では、hydrochloride群において、実験開始1週目に著明な体重減少が見られたため、これ以降、用量を2 g/kgから1 g/kgへ減量して投与することとした。実験終了時まで動物の死亡例はなく、予定通り、29日目に実験終了した。全群において、動物の状態に著変は認められなかった。Bis(2-ethylhexyl) Phthalate群について有意な体重減少を認めた。また、肝重量について、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate群では絶対重量および相対重量のいずれも有意な増加を認めた。肉眼所見では群間の相違は見られなかったが、病理組織所見では、Control群と比べて、Chlorendic acid群では門脈域を中心とした肝細胞の核周囲空胞化、N,N-Dimethylformamide群では門脈域を中心とした広範で顕

著な肝細胞の核周囲空胞化、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate群では中心静脈域を中心とした肝細胞腫大、Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride群では門脈域を中心とした肝細胞空胞化が認められた。アレイ解析の結果を肝発がん性予測モデルに入力したところ、今回検討した4物質は、103遺伝子(106遺伝子)での解析の場合、Bis(2-ethylhexyl) Phthalateのみ陽性であった。その他の3物質は肝発がん物質であるが検出できなかった。新たに作成した14遺伝子によるセットでの解析の場合、Chlorendic acidとBis(2-ethylhexyl) Phthalateのいずれも陽性と判定された。

令和4年度では、Nitrilotriacetic acid群やAcrylic acid群において有意な飲水量および摂餌量の低下が見られる週があったが、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物質のいずれも陰性という結果であった。

### D. 考察

令和2年度では、Phytic acid群では絶対重量の有意な低下が見られたが、相対重量では群間の有意差は認められず、肝重量減少は体重減少に伴う変化と考えられた。実験当初から被験物質を混じた飲水量が少なく、それに伴って摂餌量の減少および体重減少を来したと考えられる。アレイ解析からの肝発がん性予測モデルの結果について、positive controlである、Phenobarbitalや1,4-Dioxaneが発癌物質として検出されなかった。Phytic acidやCyclohexanoneについては、陰性であり、予想通りの結果となった。

令和3年度で用いた被験物質の発癌性については、Chlorendic acid, IARC Group 2B ; N,N-Dimethylformamide, IARC group 4 ; Bis(2-ethylhexyl) Phthalate, IARC Group 2B ; Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride, suspected of causing cancer (EU)とされている。103遺伝子の解析よりも14遺伝子の解析は、感度が高いと推測される。

令和4年度の4群(被験物質3群)については、一時的な摂餌量や飲水量の低下が見られたものの、各指標の群間差は見られず、肝発がん性予測モデルにおいて、3物質のいずれも陰性の結果であったことから、想定通りとなった。

### E. 結論

遺伝子セットを用いた判定の結果、令和2年度では、Phytic acidやCyclohexanoneについては、陰性であり、予想通りとなった。一方で、positive controlである、Phenobarbitalが発癌物質として検出されなかった。令和3年度は、Bis(2-ethylhexyl) Phthalateのみ陽性であり、その他の3物質は肝発がん物質であるが検出できなかった。令和4年度では、3物質のいずれも結果は陰性であり、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: 91-7.
- 2) Yokohira M, Oshima M, Yamakawa K, Ye J, Nakano-Narusawa Y, Haba R, Fukumura Y, Hirabayashi K, Yamaguchi H, Kojima M, Okano K, Suzuki Y, Matsuda Y. Adequate tissue sampling for the assessment of pathological tumor regression in pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2021; 11: 6586.
- 3) Nakano-Narusawa Y, Yokohira M, Yamakawa K, Ye J, Tanimoto M, Wu L, Mukai Y, Imaida K, Matsuda Y. Relationship between Lung Carcinogenesis and Chronic Inflammation in Rodents. *Cancers (Basel).* 2021; 13.
- 4) Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Matsuda Y, Imaida K. Lung proliferative lesion-promoting effects of left pulmonary ligation in A/J female mice.

*Pathol Int.* 2020; 70: 340-7.

- 5) Nakano-Narusawa Y, Yokohira M, Yamakawa K, Sao K, Imaida K, Matsuda Y. Single Intratracheal Quartz Instillation Induced Chronic Inflammation and Tumorigenesis in Rat Lungs. *Sci Rep.* 2020; 10: 6647.
- 6) Kishi S, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Kanie S, Hashimoto N, Sao K, Yokohira M, Imaida K, Matsuda Y. Preexisting diabetes mellitus had no effect on the no-observed-adverse-effect-level of acetaminophen in rats. *J Toxicol Sci.* 2020; 45: 151-62.

### 2. 学会発表

なし

## 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

表 1. 全研究期間のまとめ

実施年度	Groups	Treatment	Dose	No.	Body weights (g)	Liver weights		病理組織学的所見	物質特性	アレイ判定
						Absolute (g)	Relative (%)			
R2	1	1,4-Dioxane	5g/L drinking	4	384.8 ± 22.7	13.1 ± 1.0	3.4 ± 0.2	著変なし	非遺伝毒性肝発がん物質	陰性
R2	2	Phenobarbital, sodium	0.5g/L drinking	4	365.5 ± 31.5*	14.7 ± 2.0	4.0 ± 0.2	著変なし	非遺伝毒性肝発がん物質	陰性
R2	3	Phytic acid	25g/L drinking	2	276.5 ± 28.9*	9.2 ± 0.7*	3.3 ± 0.1	著変なし	非肝発がん物質	陰性
R2	4	Cyclohexanone	6.5g/L drinking	4	441.7 ± 20.3	20.7 ± 2.0*	4.7 ± 0.4*	著変なし	非肝発がん物質	陰性
R2	5	Control		4	429.5 ± 20.1	16.6 ± 1.6	3.9 ± 0.2	著変なし	-	-
R3	1	Chlorendic acid	5g/kg diet	5	333.4 ± 20.9	9.2 ± 1.5	2.7 ± 0.4	肝細胞核周囲空胞化	肝発がん物質	陰性
R3	2	N,N-Dimethylformamide	5 g/kg diet	5	334.4 ± 25.2	14.7 ± 2.7	4.4 ± 1.0	肝細胞核周囲空胞化	肝発がん物質	陰性
R3	3	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	50 g/kg diet	5	224.6 ± 48.9*	17.6 ± 3.8*	7.9 ± 1.1*	肝細胞腫大	肝発がん物質	陽性
R3	4	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	1 g/kg in water	5	328.4 ± 16.7	13.3 ± 1.4	4.1 ± 0.3	肝細胞核周囲空胞化	肝発がん物質	陰性
R3	5	Control		5	375.5 ± 32.1	12.2 ± 2.3	3.3 ± 0.5	著変なし	-	-
R4	1	Nitritriacetic acid	0.1% in water	5	388.0 ± 18.5	16.5 ± 2.2	4.2 ± 0.4	著変なし	肝発がん物質	陰性
R4	2	Acrylic acid	0.5% in water	5	404.8 ± 20.5	17.6 ± 2.0	4.3 ± 0.3	著変なし	非肝発がん物質	陰性
R4	3	Triethanolamine	2% in water	5	393.1 ± 21.7	16.7 ± 0.9	4.2 ± 0.2	著変なし	非肝発がん物質	陰性
R4	4	Control		5	395.3 ± 20.8	16.9 ± 2.2	4.3 ± 0.4	著変なし	-	-

\*P<0.05 vs control group

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2-4年度において非遺伝性肝発がん物質としてDecabromo-diphenyl oxide (decaBDE)、dl-Ethionine (DL-ET)、Doxylamine succinate (DOX)、Methapyrilene hydrochloride (MPH)、Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)の5種、優先評価化学物質としてNitrobenzene (NB)とDimethyl Terephthalate (DMT)の2種、非発がん物質としてHexachlorophene (HCP)の1種を検討した。令和2-3年度にかけてはDL-ET、DOX、HCPについて投与方法を摂餌投与から強制胃内投与に変更し、令和4年度にはDEHPを3段階の濃度を設定し、低濃度における検出力を検討した。28日間投与後の肝を用いた遺伝子発現変化による肝発がん性予測は、従来の106遺伝子モデルにおける正答率は50% (4/8物質)を示し、新規に構築した14遺伝子モデル・高感受性モデルにおいては徐々に感度は上昇したものの、特異度の低下がみられ、それぞれ正答した物質が異なるものの正答率は50% (4/8物質)であった。投与経路を摂餌から強制胃内投与にすることにより、DOXは14遺伝子・高感受性モデルで検出可能となったが共同施設全体での変化はあまり見られなかった。DEHPに関しては、いずれのモデルでも低濃度から検出可能であることを示し、判定に利用した遺伝子発現量は濃度依存性に変化した。共同施設と既存の結果と併せ、感度と特異度の両者を高く維持するモデル作成が望まれたため、令和4年度には新たに機序別統合モデルを作成し、全体で感度64%、特異度94%、正答率82%とモデルの改善を行い高精度のモデルが開発できたと考えられる。

### 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。さらに令和3年に再度、遺伝子構築を見直し再構築した14遺伝子モデルや14遺伝子モデルにおいて低用量においても判定を陽性とする高感受性モデルを構築し検討した。

### 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。被験物質は令和2年度に非遺伝性肝発がん物質としてDecabromo-diphenyl oxide (decaBDE:5%)、dl-Ethionine (DL-ET:0.1%)、Doxylamine succinate (DOX:0.2%)、非発がん物質としてHexachlorophene (HCP:0.015%)を摂餌投与した。令和3年度には投与経路を摂餌投与から強制胃内投与に変更して再度DL-ET (200 mg/kg/day)、DOX (200 mg/kg/day)、HCP (20 mg/kg/day)と新規の非遺伝性肝発がん物質としてMethapyrilene hydrochloride (MPH)、優先評価化学物質としてNitrobenzene (NB)を投与した。令和4年度は濃度変化による検出力を見るためにBis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)を0.5%、1.5%、5.0%の3つの濃度設定で摂餌投与し、新規の優先評価化学物質としてDimethyl Terephthalate (DMT)を摂餌投与した。

いずれも6週齢SD雄ラットを各群4-6匹に分け、28日間投与実験を行い、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、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220-026、21-005、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、DL-ET(200 mg/kg/day)群、MPH群、DEHP 5.0%群、NB群で有意な体重減少を認め、MPH群はday 17、28に1匹ずつ、DEHP 5.0%群はday 23に1匹死亡し、NB群はday 9にメトヘモグロビン血症がday 9に2匹にみられ day 10に1匹死亡したため、1日の休薬後半量(62.5 mg/kg/day)で投与を行った(表1)。

相対肝重量はdecaBDE群、DOX (200 mg/kg/day)群、DEHP 0.5%、1.5%、5.0%群、NB群、HCP (20 mg/kg/day)群で有意に上昇し、DEHP群では濃度依存性の変化が見られた(表1)。

表1. Control群に対する体重(%)と相対肝重量(%)

年度	投与経路	被検物質	n	平均摂取量 (mg/kg/day)	体重 (/control %)	相対肝重量 (/control %)
<b>非遺伝性肝発がん物質</b>						
R2	混餌	decaBDE 5%	4	3,678	102 ± 4%	118 ± 5% <sup>**</sup>
R2	混餌	DL-ET 0.1%	4	78	92 ± 5%	100 ± 8%
R3	胃内	DL-ET 200mg/kg/day	6	200	82 ± 9%	89 ± 6%
R2	混餌	DOX 0.2%	4	145	101 ± 4%	105 ± 3%
R3	胃内	DOX 200mg/kg/day	5	200	96 ± 3%	120 ± 9% <sup>**</sup>
R3	胃内	MPH 100mg/kg/day	3	100	72 ± 1% <sup>***</sup>	97 ± 6%
R4	混餌	DEHP 0.5%	6	358	98 ± 14%	143 ± 14%
R4	混餌	DEHP 1.5%	6	1,017	88 ± 6%	173 ± 11% <sup>***</sup>
R4	混餌	DEHP 5.0%	5	3,575	43 ± 9% <sup>**</sup>	197 ± 16% <sup>***</sup>
<b>優先評価化学物質</b>						
R3	胃内	NB 125mg/kg/day	5	125→62.5	85 ± 6% <sup>**</sup>	129 ± 11% <sup>***</sup>
R4	混餌	DMT 3.0%	6	2,428	91 ± 8%	116 ± 11%
<b>非発がん物質</b>						
R2	混餌	HCP 0.015%	4	11	101 ± 3%	108 ± 8%
R3	胃内	HCP 20mg/kg/day	5	20	89 ± 9%	117 ± 6% <sup>*</sup>

組織学的には相対肝重量の上昇した、decaBDE群、DOX (200 mg/kg/day)群、DEHP 0.5%、1.5%、5.0%群、NB群で中心静脈周囲の肝細胞腫大を観察し、DEHP群ではその程度は濃度依存性に強かった。その他、DL-ET (200 mg/kg/day)群にはKupffer細胞の増生が見られた。肝外側左葉におけるKi-67陽性率はMPH群で有意な上昇が見られたが、その他の群で明らかな上昇は見られず、DEHP群では陽性率の有意な低下が見られた(図1)。

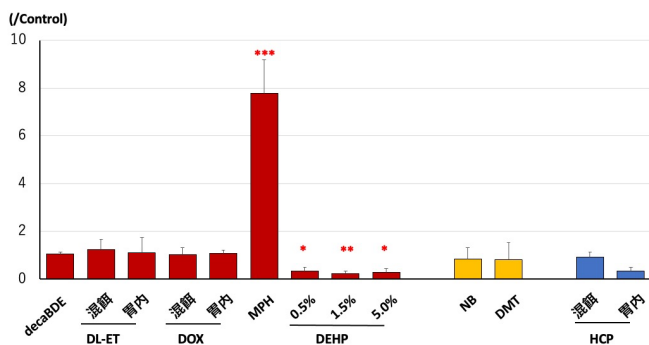


図1. Control群に対するKi-67陽性率の割合

GST-P陽性細胞の検討においてはグルタチオン抱合

などの代謝の影響でNB群やMPH群で陽性が見られたが、明らかな前癌病変と考えられるGST-P陽性細胞巢はいずれの個体にも見られなかった。

マイクロアレイデータを用いた肝発がん性予測の結果、従来の106遺伝子モデルにおける正答率は50% (4/8物質)を示した。新しく構築した14遺伝子モデルにおいてはDOXの検出が可能となったが、現在肝発がん性の確認されていない優先評価科学物質のDMTが陽性を示したため、全体としては正答率は50% (4/8物質)と変化がみられなかった。高感受性モデルに関しては、さらにDL-ETの検出が可能となったが、非発がん物質であるHCPが陽性と判定されてしまっているため、全体としては正答率は50% (4/8物質)と従来モデル、14遺伝子モデルと変化がみられなかった(表2)。

年度ごとでの比較を行うと、令和2年度で検出できなかったDOXは強制胃内投与にし、平均摂取量が145 mg/kg/dayから200 mg/kg/dayに上昇させることにより検出可能となった。

令和4年度の実験においてはDEHPは体重抑制の見られない低濃度(0.5%)から検出可能であった。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 < DEHP 0.5%群 < DEHP 1.5%群 < DEHP 5.0%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、DEHP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。

表2. 各検出モデルの結果と成否

年度	投与経路	被検物質	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
<b>非遺伝性肝発がん物質</b>								
R2	混餌	decaBDE 5%	陰性	×	陰性	×	陰性	×
R2	混餌	DL-ET 0.1%	陰性	×	陰性	×	陰性	×
R3	胃内	DL-ET 200mg/kg/day	陰性	×	陰性	×	陽性	○
R2	混餌	DOX 0.2%	陰性	×	陰性	×	陰性	×
R3	胃内	DOX 200mg/kg/day	陰性	×	陽性	○	陽性	○
R3	胃内	MPH 100mg/kg/day	陽性	○	陽性	○	陽性	○
R4	混餌	DEHP 0.5%	陽性	○	陽性	○	陽性	○
R4	混餌	DEHP 1.5%	陽性	○	陽性	○	陽性	○
R4	混餌	DEHP 5.0%	陽性	○	陽性	○	陽性	○
<b>優先評価化学物質</b>								
R3	胃内	NB 125mg/kg/day	陰性	×	陰性	×	陰性	×
R4	混餌	DMT 3.0%	陰性	○	陽性	×	陽性	×
<b>非発がん物質</b>								
R2	混餌	HCP 0.015%	陰性	○	陰性	○	陰性	○
R3	胃内	HCP 20mg/kg/day	陰性	○	陰性	○	陽性	×

### D. 考察

令和2年度~4年度にわたって8物質に対して、投与方法の変化や濃度変化をつけながら、非遺伝性肝発がん物質の遺伝子発現パターンを観察し、従来の106遺伝子で評価するとともに、新規で14遺伝子、高感受性モデルを構築し評価した。

感度に関しては従来モデルが33% (2/6物質)に対し、14遺伝子モデルでは50% (3/6物質)、高感受性モデルでは67% (4/6物質)と改善が見られるが、特異度が低下していたため正答率の改善はみられなかった。私たちの使用した物質内においては、著明な相対肝重量の上昇



(DHEP)や肝臓内Ki-67陽性の著明な上昇(MPH)などの明瞭な変化がみられるような物質においてはいずれのモデルでも検出可能であり、軽度の相対肝重量の変化や軽度の体重減少、軽度の組織学的変化(DL-ET、DOX)に関しては、14遺伝子モデルや高感受性モデルでの検出で検出可能であった。NBに関しては、いずれのモデルでも検出できなかったが、途中でメトヘモグロビン血症という肝病変以外により投与量を半量にせざるを得なかったため、肝発がんに必要な量の投与を確保できなかった可能性があり、慎重な判断が必要である。

モデルの検出感度に関してはDEHPにおいて低濃度(0.5%)においても検出可能であり、同濃度はFischer 344ラットを用いた103週の長期混餌投与実験で、腫瘍発生増加を認めた6,000 ppmより低い濃度であるため、DEHPにおいては長期試験と同程度の濃度で検出可能であることを示す事ができた。

投与方法に関しては、胃内投与によってDOXのみ投与濃度が145 mg/kg/dayから200 mg/kg/dayに上昇し、14遺伝子モデルや高感受性モデルで検出可能となった。私たちの実験では改善がみられたが、共同施設全体でDOXのみの変化にと留まり、投与方法による大きな違いは観察されなかった。

モデルの検討は共同施設やこれまで検討した全体での評価を要するが、概ね傾向は同様であり、従来モデル、14遺伝子モデル、高感受性モデルで感度はそれぞれ39%(14/36物質)、53%(19/36物質)、67%(24/36物質)、特異度は100%(53/53物質)、96%(51/53物質)、76%(68/89物質)となり、感度と特異度の両者を高く維持するモデル作成が望まれた。そのため、令和4年度には新たに機序別統合モデルを作成し、全体で感度64%、特異度94%、正答率82%とモデルの改善を行い高精度のモデルが開発できたと考えられる(代表者総括参照)。

## E. 結論

非遺伝毒性肝発がん物質を短期で検出するための遺伝子セットの構築は従来モデルと比較し、より精度の高いモデルを構築できたが、より精度の改善や多様な物質での検討を積み重ねる必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.

- 9) Asano G, Miyabe K, Kato H, Yoshida M, Sawada T, Okamoto Y, Sahashi H, Atsuta N, Kachi K, Kato A, Jinno N, Natsume M, Horii 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.
- 10) Tsuda H, Yoshida M, Akiyama F, Ohi Y, Kinowaki K, Kumaki N, Kondo Y, Saito A, Sasaki E, Nishimura R, Fujii S, Homma K, Horii R, Murata Y, Itami M, Kajita S, Kato H, Kurosumi M, Sakatani T, Shimizu S, Taniguchi K, Tamiya S, Nakamura H, Kanbayashi C, Shien T, Iwata H. Nuclear grade and comedo necrosis of ductal carcinoma in situ as histopathological eligible criteria for the Japan Clinical Oncology Group 1505 trial: an interobserver agreement study. *Jpn J Clin Oncol.* 2021; 51: 434-43.
- 11) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 2021; 336: 32-8.
- 12) Subhawa S, Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Komura M, Nagano-Matsuo A, Yeewa R, Inaguma S, Chewonarin T, Banjerdpongchai R, Takahashi S. Suppressive Effect and Molecular Mechanism of *Houttuynia cordata* Thunb. Extract against Prostate Carcinogenesis and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers (Basel).* 2021; 13.
- 13) Nishikawa S, Uemoto Y, Kim TS, Hisada T, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Dong Y, Sugiura H, Okuda K, Kato H, Osaga S, Takahashi S, Toyama T. Low RAI2 expression is a marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2021; 187: 81-93.
- 14) Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, Kato H, Naiki-Ito A, Watanabe K, Nagayasu Y, Hosokawa Y, Takiguchi S, Kasugai K, Kasai K, Inaguma S, Takahashi S. PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients. *Virchows Arch.* 2021; 479: 277-84.
- 15) Matsuyama N, Naiki T, Naiki-Ito A, Chaya R, Kawai T, Etani T, Nagai T, Kato H, Kubota Y, Yasui T. Novel case of androgen receptor-positive cancer of unknown primary without serum prostate-specific antigen elevation that became progression free in the long term after primary combined androgen blockade. *IJU Case Rep.* 2021; 4: 59-63.
- 16) Kato H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* 2021; 42: 940-50.
- 17) Kachi K, Kato H, Naiki-Ito A, Komura M, Nagano-Matsuo A, Naitoh I, Hayashi K, Kataoka H, Inaguma S, Takahashi S. Anti-Allergic Drug Suppressed Pancreatic Carcinogenesis via Down-Regulation of Cellular Proliferation. *Int J Mol Sci.* 2021; 22.
- 18) Isobe T, Naiki T, Naiki-Ito A, Kawai T, Etani T, Nagai T, Nozaki S, Kobayakawa Y, Iwatsuki S, Matsuyama N, Kato H, Kawai N, Yasui T. Rare case of immunoglobulin G4-related disease arising in gonadal glands with long-term remission without steroid treatment: Discussion and literature review. *IJU Case Rep.* 2021; 4: 188-91.
- 19) Aoyama Y, Naiki-Ito A, Xiaochen K, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Inaguma S, Tsuda H, Tomita M, Matsuo Y, Takiguchi S, Takahashi S. Lactoferrin Prevents Hepatic Injury and Fibrosis via the Inhibition of NF-kappaB Signaling in a Rat Non-Alcoholic Steatohepatitis Model. *Nutrients.* 2021; 14.
- 20) Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 2020; 12.
- 21) Uemoto Y, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Asano T, Hisada T, Nishikawa S, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Okuda K, Sugiura H, Kato H, Takahashi S, Toyama T. Sentinel lymph node biopsy may be unnecessary for ductal carcinoma in situ of the breast that is small and diagnosed by preoperative biopsy. *Jpn J Clin Oncol.* 2020; 50: 1364-9.
- 22) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
- 23) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita

- Y, Takahashi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. *Toxicology*. 2020; 429: 152325.
- 24) Nozaki S, Naiki T, Naiki-Ito A, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T. Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis. *Andrology*. 2020; 8: 1895-906.
- 25) Nakanishi H, Sawada T, Kaizaki Y, Ota R, Suzuki H, Yamamoto E, Aoki H, Eizuka M, Hasatani K, Takahashi N, Inagaki S, Ebi M, Kato H, Kubota E, Kataoka H, Takahashi S, Tokino T, Minamoto T, Sugai T, Sasaki Y. Significance of gene mutations in the Wnt signaling pathway in traditional serrated adenomas of the colon and rectum. *PLoS One*. 2020; 15: e0229262.
- 26) Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis*. 2020; 41: 1145-57.
- 27) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol*. 2020; 94: 4085-97.
- 28) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules*. 2020; 25.
- 29) Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Toyama T, Takahashi S. The standard form of CD44 as a marker for invasion of encapsulated papillary carcinoma of the breast. *Pathol Int*. 2020; 70: 835-43.
- 30) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagai T, Etani T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway. *Cancer Sci*. 2020; 111: 1165-79.
2. 学会発表
- 1) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、山下依子、稲熊真悟、高橋智. LuteolinはSTAT3経路とDPD発現を低下させ膵発癌を抑制する. 第109回日本病理学会総会、福岡(2020年4月)
  - 2) 加藤寛之、内木綾、小村理行、稲熊真悟、高橋智. Ellagic acid prevents pancreatic carcinogenesis in hamster model. 第79回日本癌学会学術総会、広島(2020年10月)
  - 3) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、高橋智. エラグ酸の膵発癌抑制効果と膵癌におけるレジスチンの効果の検討. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、浜松(2021年1月)
  - 4) 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智. エラグ酸の膵発癌抑制効果の検討. 第110回日本病理学会総会、東京(2021年4月)
  - 5) 加藤寛之、内木綾. STAT3-DPYD経路を介したLuteolinの膵癌化学予防効果の検討. 第27回日本食品化学学会学術大会、東京(2021年6月)
  - 6) 加藤寛之、内木綾、稲熊真悟、小村理行、高橋智. DPYD regulation in pancreatic cancer cell 第80回日本癌学会学術総会、横浜(2021年10月)
  - 7) 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智. 膵癌におけるDPYD発現の寄与と発現抑制機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸(2022年1月)
  - 8) 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)
  - 9) 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)
  - 10) 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)
  - 11) 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回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京(2023年1月)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
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による毒性や発がん性の標的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。まずは、「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」を含む6化学物質を用いたラット単回投与を行い、投与24時間後の肝臓におけるマーカー遺伝子（10遺伝子）の発現データをqPCRで取得し、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（検出モデル-1）を用いて肝発がん性を予測した。その結果、「陽性」と判定されたものは、2遺伝毒性肝発がん物質であった。しかし、「優先評価化学物質」の1物質を含めた3遺伝毒性肝発がん物質は「陰性」と判定された。これまでに検討した69物質に対して、検出モデル-1は遺伝毒性肝発がん物質を、感度83%、特異度95%、正答率90%の精度で検出できた。次に、さらなる精度向上のため、偽陰性になった遺伝毒性肝発がん物質についても検出できる補完モデル（検出モデル-2）の開発を行った。これまでに検出モデル-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種類について検出モデル-2を用いて検討した結果、上述の5つの遺伝毒性発がん物質のうち4つが「陽性」と判定された。さらに、検出モデル-1と検出モデル-2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%の精度で検出可能であることが明らかになった。以上より、我々が2つの遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルを組み合わせることで、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。

### 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」（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）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検出

できる評価法を構築することにある。多数の化学物質を同時に評価することにより、評価法の標準化を推進し、国際動向を見据えたOECDテストガイドライン化を目指すことが本研究の独創的な点である。

令和2年度は、既知遺伝毒性発がん物質、「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」6物質について検討した。令和3年度は、前年度の検討において、陰性と判定された遺伝毒性陽性であるが発がん性不明の「監視化学物質」及び偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質について投与用量を上げて検討した。令和4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について、新たな肝発がん検出モデルを作成し検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 実験1（令和2年度）

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

得られた遺伝子発現データをこれまでに構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル(検出モデル-1)に入力し、判定を行った。

表 1. 令和 2 年度に検討した遺伝毒性肝発がん物質(検出モデル-1)

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

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

## 2. 実験 2 (令和 3 年度)

6 週齢の雄 SD ラットを 7 群に分け、被験物質の単回強制胃内投与試験を行った。被験物質を表 2 に記す。令和 2 年度に、陰性と判定された 4 物質 (監視対象化学物質である DB-134)、優先評価化学物質である OPD、既知の遺伝毒性肝発がん物質である Safrole 及び ADBAQ を用いた。DB-134 及び ADBAQ の投与用量を令和 2 年度の 1000 mg/kg から OECD TG420 急性経口毒性試験において定められている最高用量の 2000 mg/kg に上げた。OPD の投与用量を令和 2 年度の 170 mg/kg (1/3 of LD50) から 340 mg/kg (2/3 of LD50) 及び 510 mg/kg (LD50) に、Safrole の投与用量を令和 2 年度の 650 mg/kg (1/3 of LD50) から 1300 mg/kg (2/3 of LD50) と 1950 mg/kg (LD50) にそれぞれ上げた。なお、溶媒対照群(対照群)として 0.5% MC 投与群を設けた。

得られた遺伝子発現データを検出モデル-1 に入力し、判定を行った。

表 2. 令和 3 年度に検討した遺伝毒性肝発がん物質(検出モデル-1)

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

\*OECD TG420急性経口毒性試験において定められている最高用量  
#LD50の1/3に相当する用量  
###LD50に相当する用量

## 3. 実験 3 (令和 4 年度)

新たな遺伝毒性肝発がん物質検出モデル作成に用い

た物質を表 3 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 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 OPD、既知の遺伝毒性肝発がん物質である 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(検出モデル-2)を作成した。

表 3. 令和 4 年度に検討した遺伝毒性肝発がん物質(検出モデル-2)

被験物質	分類	LD50 (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
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

新たに作成した検出モデル-2 に、2-NP、Vinyl bromide (VB)、OPD、4,4'-Diaminodiphenyl ether (ODA)、DB-134 及び Safrole の遺伝子発現結果を入力し、判定を行った。

## 4. RNA 抽出及び遺伝子発現解析

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

遺伝子発現については、リアルタイム PCR (qPCR) にてデータを取得した。肝臓からの total RNA 抽出と cDNA の合成はそれぞれ RNeasy mini kit (キアゲン) と Super Script VI VIL0 Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

(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

#### 1. 実験1 (令和2年度)

qPCRで取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデル-1に入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った(表1)。本モデルでは、遺伝毒性ラット肝発がん物質を「陽性」、その他の物質を「陰性」と判定する。その結果、「陽性」と判定されたものは、遺伝毒性肝発がん物質である2物質(2-NF, 2-AAQ)であった。しかし、それ以外の3遺伝毒性肝発がん物質は「陰性」と判定された。遺伝毒性陽性で発がん性不明であるDB-134は「陰性」と判定された。

#### 2. 実験2 (令和3年度)

取得した遺伝子発現データを検出モデル-1に入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った(表2)。その結果、本年度に検討した4物質(DB-134、OPD、Safrole及びADBAQ)はすべて「陰性」と判定された。

#### 3. 実験3 (令和4年度)

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(表3)。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-2が確立できた。一方、2NP、ODA、及びDB-134は陰性と判定された。

### D. 考察

我々が構築した検出モデル-1は遺伝毒性肝発がん物質を、感度83%、特異度95%、正答率90%の精度で検出できることが示された。一方、遺伝毒性肝発がん物質であるOPD、Safrole及びADBAQが2000 mg/kgあるいはLD50用量においても、「陰性」と判定されたことから、検出モデル-1の検出力に限界がある可能性が示された。

新たに作成した検出モデル-2において、これまでに検出モデル-1を用いた検討において、偽陰性となった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、今までの検出モデル-1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モデル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はいずれのモデルにおいても「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ことが明らかになった。

### 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-1およびモデル-2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。

### 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) 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.
- 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) 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) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 2021; 336: 32-8.
- 7) Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H. Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability. *Cell Rep.* 2021; 37: 109988.
- 8) Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 3613.
- 9) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S,

- Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2021; 13: 1216.
- 10) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2020; 96: 180-7.
  - 11) Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani T. Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-resistant bladder cancer. *Cancer Lett*. 2020; 479: 89-99.
  - 12) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol*. 2020; 33: 279-85.
  - 13) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2020; 21.
  - 14) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol*. 2020; 94: 927-37.
2. 学会発表
- 1) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミンacetoaceto-o-toluidideのラット膀胱発がん性とその機序解明. 第93回産業衛生学会、Web開催 (2020年4月)
  - 2) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto-o-toluidide の膀胱発がん促進作用. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web開催 (2020年6月)
  - 3) 鰐淵英機、魏民. 職業曝露によるがん発生の要因解明と予防研究への展開. 第 27 回がん予防学会総会、Web開催 (2020年9月)
  - 4) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. ラット膀胱尿路上皮のニコチンによる増殖はNADPH oxidase阻害剤apocyninにより抑制される. 第79回日本癌学会学術総会、Web開催 (2020年10月)
  - 5) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web開催 (2020年10月)
  - 6) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase阻害剤 apocyninによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web開催 (2021年1月)
  - 7) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web開催 (2021年1月)
  - 8) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2 の解明. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web開催 (2021年1月)
  - 9) 鈴木周五、魏民、鰐淵英機. Luteolinによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第110回日本病理学会総会、東京 (2021年4月)
  - 10) 藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐淵英機. アグリコン型イソフラボンによるホルモン活性がDonryuラットにおける乳がんおよび子宮内膜がんの発生を促進する. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催 (2021年6月)
  - 11) 梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. Pueraria mirificaのエストロゲン作用によるDonryuラットにおける乳がんの発生. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催 (2021年6月)
  - 12) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年7月)
  - 13) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年7月)
  - 14) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 2021年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS)】」若手支援技術講習会、Web開催 (2021年9月)
  - 15) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露芳香族アミン類による膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝物の関係. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 16) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 17) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)

- 18) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年9月)
- 19) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響及び尿中代謝物との関係. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
- 20) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 1, 4-ジオキサンのin vivo変異原性及び発がん性の定量解析. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
- 21) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、山口貴嗣、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
- 22) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐淵英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
- 23) 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐淵英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤AcetazolamideのWnt/ $\beta$ カテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022年1月)
- 24) 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)
- 25) 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)
- 26) 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)
- 27) 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)
- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) 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)
- 31) 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)
- 32) 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)
- 33) 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)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) 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)
- 37) 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.  $\gamma$ 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)
- 38) 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)
- 39) 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)
- 40) 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)
- 41) 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)
- 42) 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)
- 43) 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

研究分担者 戸塚 ゆ加里 日本大学薬学部環境衛生学 教授

### 研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、高分解能精密質量分析装置(HRAM)を用いた DNA 付加体の網羅的解析手法(HRAM-アダクトーム)を用いた遺伝毒性/発がん性予測モデルの構築に取り組んできた。令和2年度は、それまでの2年間で実施したデータセット(2018データセットおよび2019データセット)を統合し、複数の遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価を、当該研究により構築したHRAM-アダクトーム法により検討した。令和3年度は、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、令和4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、「++」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や解析ソフトの条件設定の検索を行い、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、 $\epsilon$ -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。 $\epsilon$ -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。

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"> <li>遺伝毒性ラット肝発がん物質 (+/+): 9種 o-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (MDA), 4,4'-Thiodianiline (TDA), N-Nitrosodichloramine (NDEA), N-Nitrosoethanolamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethanamine (NEMA), Nitrosodibutylamine (NB), N-Nitrosopyrrolidine (NPN)</li> <li>遺伝毒性非肝発がん物質 (+/+): 3種 Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT)</li> <li>非遺伝毒性肝発がん物質 (+/+): 2種 Monocrotaline (MCT), Phenobarbital (PB)</li> <li>非遺伝毒性非肝発がん物質 (+/+): 16種 Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI), Indomethacin (IM), Phenylbutazone (PhB), Promethazine (PMZ), Sulindac (SUL), Tetracycline (TC), Ethionamide (ETH) Theophylline (TEO), Caffeyne (CAF), Chloramphenicol (CMP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>遺伝毒性ラット肝発がん物質 (+/+): 13種 4,4'-Oxydianiline (44-ODA), Auramine-O (AO), Acid Red 26 (C1-16150)(AR-26), Benzidine (BZ), Dichloroacetic Acid (DCA), Ethylene thiourea (ETU), Hydrazinium Sulfate (HS), Hydrazine (HZ), 4,4'-Methylene-bis[2-chloro-aniline](MBOCA), Nitrosodiphenylamine (NDMA), Retorsine (RTS), Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP), Vinyl Bromide (VB)</li> <li>遺伝毒性非肝発がん物質 (+/+): 2種 2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene) (DNT), Isonicotinic Acid Hydrazide (INH)</li> <li>非遺伝毒性肝発がん物質 (+/+): 5種 Carbon Tetrachloride (CCL4), Coumarine (Coumarine), Ethynylestradiol (EE), Gemfibrozil (GFZ), Hexachlorobenzene (HCB)</li> <li>非遺伝毒性非肝発がん物質 (+/+): 8種 Allyl alcohol (AA), Butylated hydroxyanisole (BHA), Chlorpheniramine (CHL), Chlorpropamide (CP), Furosemide (FUR), Methylodopa (MDP), Methimazole (MTZ), Sulfasalazine (SS)</li> </ul>
<p>陽性対照 2-Nitropropane (2-NP)</p>	<p>陰性対照 Methyl cellulose (MC)</p>

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シドに消化した後、LC-TOF MS に供し DNA 付加体の網羅解析を行った。得られたデータは SCIEX 社が提供するバイオインフォマティクス解析ソフトウェアを用い、デオキシリボヌクレオシドに特徴的なニュートラルロス (-116.04736) 及び各種核酸に特異的なニュートラルロス (-152.0572; dG, -136.0623; dA, -112.0511; dC, -127.0508; dT) を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように系をデザインした。

令和 2 年度は得られたすべてのデータを用い、主成分判別分析 (PCA-DA) により解析した。

令和 3-4 年度は、これらのうち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。

### (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

令和 2 年度は各種化学物質を投与したラット肝臓 DNA のアダクトーム解析を行なった。LDA 解析を行なったと

ころ、2018 データセット単独、2019 データセット単独、及び 2018+2019 データセットのいずれにおいても、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の 4 つのグループに綺麗に分離されることがわかった。Leave-One-Out 交差検証により化学物質の遺伝毒性/発がん性を予測するモデルを機械学習手法 (ランダムフォレストを使用) を用いて試作した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いて 2018+2019 統合データセットに対して予測を行ったところ、遺伝毒性/肝発がん性の予測結果は 49%、遺伝毒性の予測結果が 50%、肝発がん性の予測結果は 65% と 2018 年データセット単独の結果と比べ正答率が低くなった (表 2)。

表 2. 遺伝毒性の予測結果

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

令和 3 年度は、2018 年および 2019 年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し、今年度 HRAM-アダクトームの再分析を実施した結果を図 1 に示す (2021 データ)。LDA 解析を行なったところ、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の 4 つのグループに分離されることがわかった。

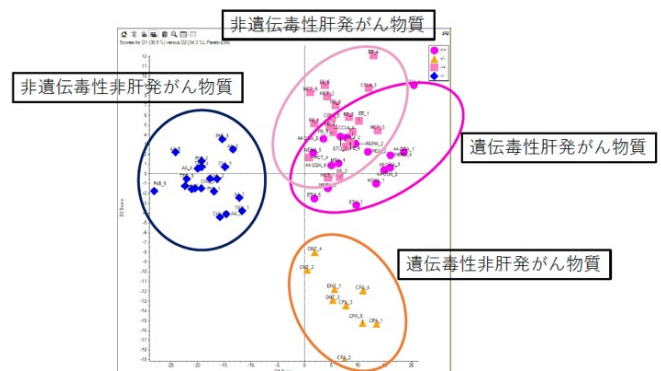


図 1. 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価 (LDA 解析による)

Leave-One-Out 交差検証により化学物質の遺伝毒性/発がん性を予測するモデルを機械学習手法 (ランダムフォレストを使用) を用いて試作した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いて 2021 年データセットに対して予測を行ったところ、予測結果が低いことがわかった (表 3)。

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

データより10-30%増加した。

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

表3. 遺伝毒性の予測結果

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

Leave-One-Out 交差検証による正答率の評価

令和4年度は、それまでの結果から、PCA-DAのクラスター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L00CVの検討を実施した。まず物質毎のL00CV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%）。毒性的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（図2）、毒性予測モデルでも「+-」の物質をL00CV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L00CVでテストしたとき「+-」に誤答する傾向が見られた（図2、表4）。

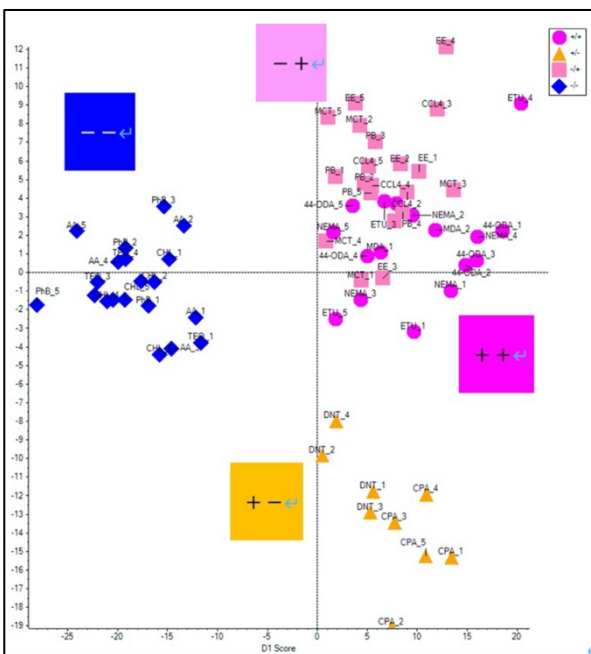


図2. 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価（PCA-DAによる）

表4. 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+0	予測--
AA	--	2019	4	5	0.8	0	0	1	4
CHL	--	2019	4	5	0.8	0	0	1	4
PhB	--	2018	5	5	1	0	0	0	5
TEO	--	2018	5	5	1	0	0	0	5
CCL4	+-	2019	3	5	0.6	2	0	3	0
EE	+-	2019	5	5	1	0	0	5	0
MCT	+-	2018	1	5	0.2	2	0	1	2
PB	+-	2018	0	5	0	1	0	0	4
CPA	+-	2018	0	5	0	0	0	4	1
DNT	+-	2019	0	4	0	2	0	1	1
44-ODA	++	2019	2	5	0.4	2	0	3	0
ETU	++	2019	0	5	0	0	0	4	1
MDA	++	2018	1	2	0.5	1	0	1	0
NEM A	++	2018	1	5	0.2	1	0	4	0
合計			31	66	0.47				

次にサンプル毎のL00CV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%）。毒性的の平均的な正答率は、「--」は90%（物質毎のL00CVと変化なし）、「+-」は45%（物質毎のL00CVよりも35ポイント増加）、「++」は0%（物質毎のL00CVと変化なし）、「++」は24%（物質毎のL00CVよりも6ポイント増加）であった。また、PCA-DA（図3）でクラスターの一部が重なった「+-」と「++」について、物質毎のL00CV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5）。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。

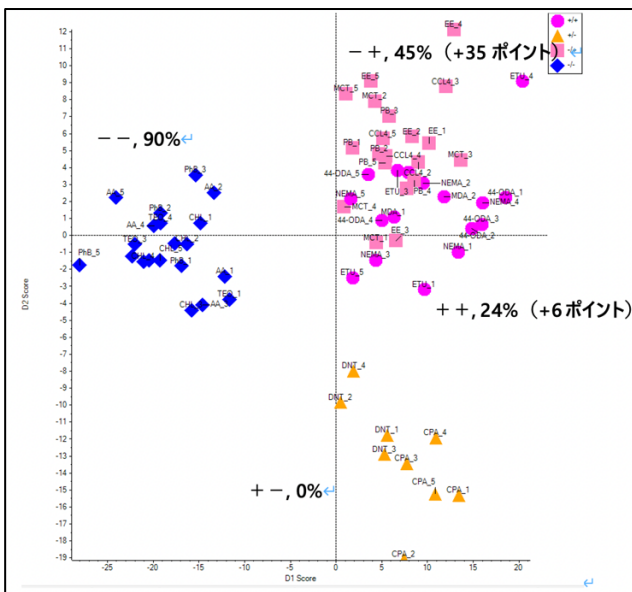


図3. サンプル毎の分類クラス別正答率。括弧内の数値は物質毎の正答率からの変化

表5. 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+0	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
NEM A	++	2018	1	5	0.2	1	0	4	0
合計			23	66	0.35				

## 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6）。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 L00CV よりもサンプル別 L00CV 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6. 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のみを用いた毒性予測モデルを構築・評価した（表7）。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 L00CV よりもサンプル別 L00CV 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 L00CV に関わらず、LDA による毒性予測結果は83%であった。

表7. 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

## 5-methyl-dC によるデータの標準化

2018年測定データセットと2019年測定データセットを統合し、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、「++」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4）。

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（図5、6）。

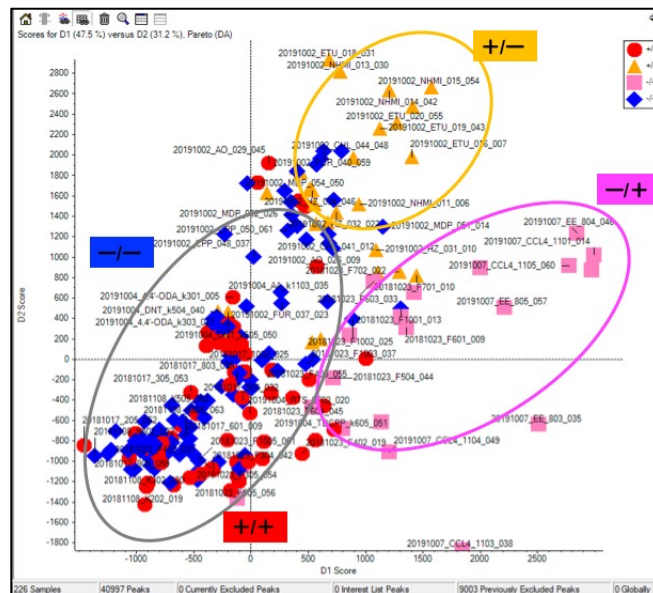


図4. 5-methyl-dC による標準化と PCA-DA 解析

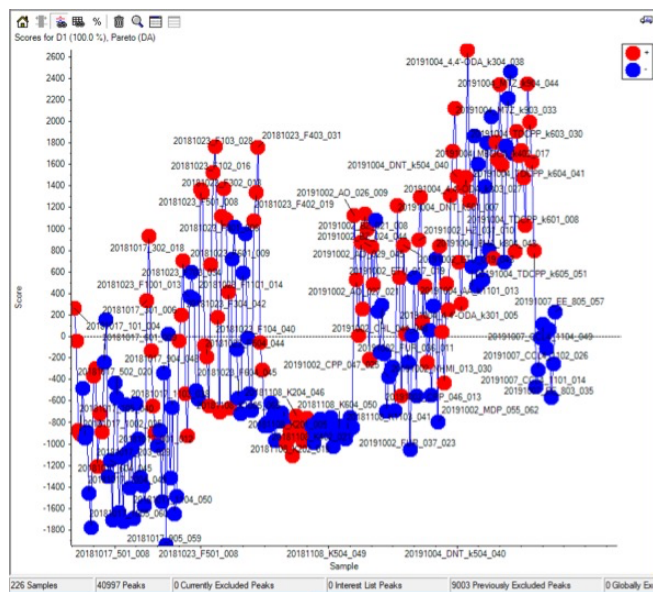


図5. 遺伝毒性の有無による分類

## 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7）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8）に起因すると考えられる。

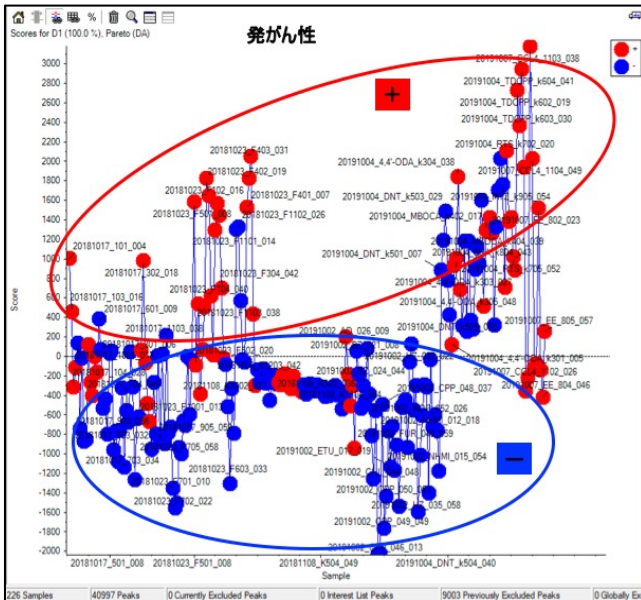


図 6. 発がん性の有無による分類

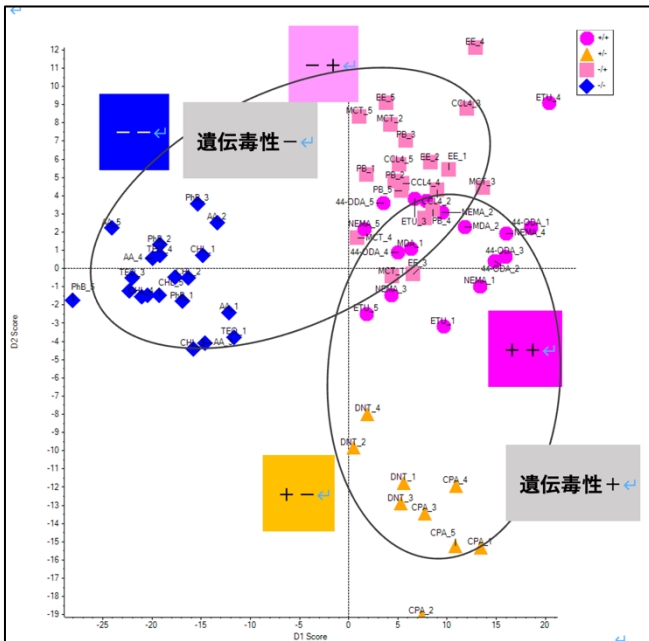


図 7. 2021年度測定データのPCA-DA (遺伝毒性)

令和4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。遺伝毒性の有無、発がん性の有無のみで分類した結果、発がん性の有無ではデータの分離傾向が観察され、2021年データセットのLDAを用いた予測結果と一致した。今後、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」に置き換えた場合には、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、「++」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や解析ソフトの条件設定の検索を行い、正答率の向上に向けて検討していく予定である。

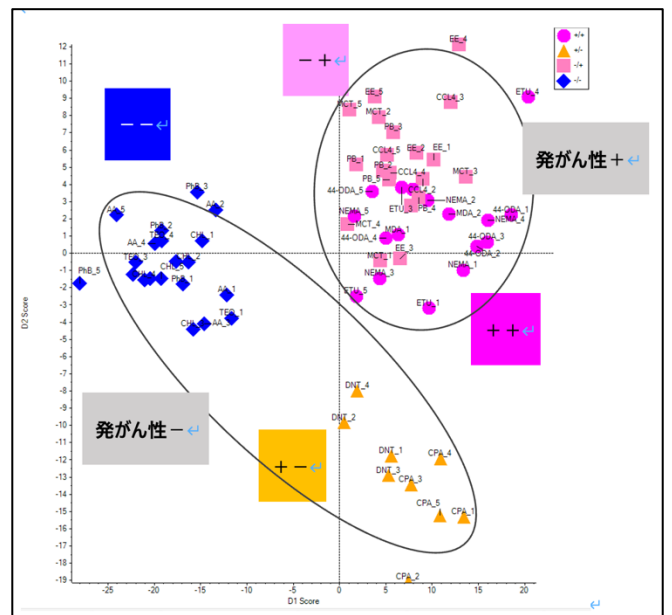


図 8. 2021年度測定データのPCA-DA (発がん性)

### 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.
  - 3) Komiya M, Ishigami R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y. Establishment of Novel Genotoxicity Assay System Using Murine Normal Epithelial Tissue-Derived Organoids. *Front Genet.* 2021; 12: 768781.
  - 4) Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, Totsuka Y, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. *In Vivo.* 2021; 35: 2107-14.
  - 5) Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. *o*-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N(4)-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 2021; 34: 912-9.
  - 6) Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.* 2021; 112: 7-15.
  - 7) Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putscharen O, Suwanpimolkul G, Jantarabenjakul W, Paitoonpong L, Handley FG, Bernabe KG, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I. U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. *Virology.* 2021; 555: 71-7.
  - 8) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel *o*-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 2020; 33: 1907-14.
  - 9) Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ.* 2020; 42: 16.
  - 10) Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis.* 2020; 41: 368-76.
  - 11) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2020; 96: 180-7.
2. 学会発表
- 1) 戸塚ゆ加里. NGSによるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望. 第47回日本毒性学会学術年会シンポジウム、Web開催 (2020年6月)
  - 2) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望. がん予防学術大会、Web開催 (2020年9月)
  - 3) 戸塚ゆ加里. Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach、広島、第79回癌学会 (2020年10月)
  - 4) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによりがんの要因を解明する. 第2回 三陸包括的緩和医療研究会、Web開催 (2020年10月)
  - 5) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望. 第49回 環境変異原学会、静岡 (2020年9月)
  - 6) 戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としてのDNAアダクトーム解析の展望. 第37回 日本毒性病理学会、Web開催 (2021年1月)
  - 7) 戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としてのDNAアダクトーム解析の展望. 第12回 JBFシンポジウム、Web開催 (2021年3月)
  - 8) 戸塚ゆ加里. 質量分析機器を用いたDNA付加体の網羅的解析手法 (DNAアダクトーム) の現状と将来展望. 第81回分析化学討論会、Web開催 (2021年5月)
  - 9) 戸塚ゆ加里. DNA付加体の網羅的解析手法 (DNAアダクトーム) の現状と将来展望. 第144回日本薬理学会関東支部会、Web開催 (2021年6月)
  - 10) 戸塚ゆ加里. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
  - 11) 戸塚ゆ加里. 生体を模倣した*in vitro*遺伝毒性評価. 第50回 環境変異原学会、横須賀 (2021年11月)
  - 12) 戸塚ゆ加里. ゲノムおよびDNA付加体の網羅的解析により環境因子とがん発生との関連を解明する.

- 第95回日本薬理学会、福岡（2022年3月）
- 13) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルに特化した新規 *in vitro* 生体模倣評価系の開発. 日本薬学会 第142年会、Web開催（2022年3月）
  - 14) 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）
  - 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）
  - 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) 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)
  - 18) 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)
  - 19) Totsuka Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. 13th International Conference on Environmental Mutagens, Ottawa (2022年8月)
  - 20) 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）
  - 21) 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）
  - 22) 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）
  - 23) 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）
  - 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51回環境変異原学会、広島（2022年11月）
  - 25) 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）
  - 26) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望. 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）
  - 27) 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
<u>Toyoda T</u> , 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 $\gamma$ -H2AX.	J Toxicol Sci.		in press	2023
<u>Yamaguchi T</u> , <u>Gi M</u> , <u>Fujioka M</u> , <u>Suzuki S</u> , <u>Oishi Y</u> , <u>Wanibuchi H</u> .	A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks.	J Toxicol Sci.	36	123-9	2023
<u>Yokota Y</u> , <u>Suzuki S</u> , <u>Gi M</u> , <u>Yanagibana Y</u> , <u>Yoneda N</u> , <u>Fujioka M</u> , <u>Kakehashi A</u> , <u>Koda S</u> , <u>Suemiizu H</u> , <u>Wanibuchi H</u> .	o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice.	Toxicology	488	153483	2023
<u>Matsushita K</u> , <u>Toyoda T</u> , <u>Akane H</u> , <u>Morikawa T</u> , <u>Ogawa K</u> .	A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats.	Food Chem Toxicol.	175	113702	2023
<u>Yamada T</u> , <u>Toyoda T</u> , <u>Matsushita K</u> , <u>Akane H</u> , <u>Morikawa T</u> , <u>Cho YM</u> , <u>Ogawa K</u> .	Persistent $\gamma$ -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 $\gamma$ -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, Ohashi M, Tomono S, Hady R, Fukamachi 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, 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)	14		2022
Oikawa D, Gi M, Kosaka 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.	13	694	2022
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.	628	91-7	2022
Narita T, Tsunemitsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoyama T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M.	Induction of DNA Damage in Mouse 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, 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 behavioral phenotype.	Brain Commun.	4	fcac220	2022
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.	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 Value in Selecting nab-Paclitaxel and Gemcitabine 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, Asano 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

<p>Deguchi S, Tanaka H, <u>Suzuki S</u>, Natsumi S, Mori T, Miki Y, Yoshii M, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, <u>Wanibuchi H</u>, Ohira M.</p>	<p>Clinical relevance of tertiary lymphoid structures in esophageal squamous cell carcinoma.</p>	<p>BMC Cancer</p>	<p>22</p>	<p>699</p>	<p>2022</p>
<p>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, <u>Kato H</u>, Kopczyński J, Michal M, Michal M, Peksa R, Prochorec-Sobieszek M, Starzynska A, Takahashi S, Wasag B, Kowalik A, Miettinen M.</p>	<p>A molecular genetics and immunohistochemical study of 90 cases and comprehensive review of the literature.</p>	<p>Mod Pathol.</p>	<p>35</p>	<p>1609-17</p>	<p>2022</p>
<p>Asano G, Miyabe K, <u>Kato H</u>, 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.</p>	<p>Relevance of gene mutations and methylation to the growth of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms based on pyrosequencing.</p>	<p>Sci Rep.</p>	<p>12</p>	<p>419</p>	<p>2022</p>
<p>Arakawa N, Ushiki A, Abe M, Matsuyama S, Saito Y, Kashiwada T, Horimatsu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Miyashita K, Saito K, Nakamura R, <u>Toyoda T</u>, Ogawa K, Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiyama T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M.</p>	<p>Stratifin as a novel diagnostic biomarker in serum for diffuse alveolar damage.</p>	<p>Nat Commun.</p>	<p>13</p>	<p>5854</p>	<p>2022</p>

kane H, <u>Toyoda T</u> , Mizuta Y, Cho Y M, 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.	42(10)	1603-17	2022
<u>Yokohira M</u> , Oshima M, Yamakawa K, Ye J, Nakano-Narusawa Y, Haba R, Fukumura Y, Hirabayashi K, Yamaguchi H, Kojima M, Okano K, Suzuki Y, Matsuda Y.	Adequate tissue sampling for the assessment of pathological tumor regression in pancreatic cancer.	Sci Rep.	11	6856	2021
Yamamoto E, Tachibashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, <u>Toyoda T</u> , Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izuetsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Torimura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y.	Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging.	Int J Pharm.	595	120241	2021
Yamada T, <u>Toyoda T</u> , Matsushita K, Cho YM, Akagi JI, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K.	Expression of stem cell markers as useful complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for gamma-H2AX.	Arch Toxicol.	95	715-26	2021
Yamada T, <u>Toyoda T</u> , Ide T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K.	Neuromuscular and vascular hamartoma of the small intestine in an F344 rat.	J Toxicol Pathol.	34	113-7	2021

Tsuda H, Yoshida M, Akiyama F, Ohno Y, Kinowaki K, Kumaki N, Kondo Y, Saito A, Sasaki E, Nishimura R, Fujii S, Homma K, Horii R, Murata Y, Itami M, Kajita S, <u>Kato H</u> , Kurosumi M, Sakatani T, Shimizu S, Taniguchi K, Tamiya S, Nakamura H, Kanbayashi C, Shien T, Iwata H.	Nuclear grade and comedo necrosis of ductal carcinoma in situ as histopathological eligible criteria for the Japan Clinical Oncology Group 1505 trial: an interobserver agreement study.	Jpn J Clin Oncol.	51	434-43	2021
<u>Toyoda T</u> , Matsushita K, Akane H, Morioka T, Ogawa K.	A 13-week subchronic toxicity study of 2-(1-menthoxy)ethanol in F344 rats.	J Toxicol Pathol.	34	309-17	2021
<u>Totsuka Y</u> , Watanaabe M, Lin Y.	New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer.	Cancer Sci.	112	7-15	2021
Takahashi M, Hamaya T, Narita T, Fujii G, <u>Totsuka Y</u> , Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M.	Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice.	In Vivo.	35	2107-14	2021
Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, <u>Wanibuchi H</u> , Azumi A, Honda S.	Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	259	3127-36	2021

Suzuki S, Cohen S, M, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanyibuchi H, Takahashi S.	Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin.	Toxicol Lett	336	32-8	2021
Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, Wanyibuchi H, Azumi A, Honda S.	Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	259	3127-36	2021
Suzuki S, Cohen S, M, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanyibuchi H, Takahashi S.	Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin.	Toxicol Lett	336	32-8	2021
Subhawa S, Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Komura M, Nagano-Matsuo A, Yeewa R, Inaguma S, Chewonarin T, Banjerdpongchai R, Takahashi S.	Suppressive Effect and Molecular Mechanism of Houltuynia cordata Thunb. Extract against Prostate Carcinogenesis and Castration-Resistant Prostate Cancer.	Cancers (Basel)	13		2021
Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H.	Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability.	Cell Rep.	37	109988	2021
Nishikawa S, Uemoto Y, Kim TS, Hisada T, Kondo N, Watanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Dong Y, Sugiura H, Okuda K, Kato H, Osaga S, Takahashi S, Toyama T.	Low RAI2 expression is a marker of poor prognosis in breast cancer. Breast Cancer Res Treat.	Cancer Res Treat	187	81-93	2021



Nakano-Narusawa Y, <u>Yokohira M</u> , Yamakawa K, Ye J, Tanimoto M, Wu L, Mukai Y, Imaida K, Matsuda Y.	Relationship between Lung Carcinogenesis and Chronic Inflammation in Rodents.	Cancers (Basel)	13		2021
Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, <u>Kato H</u> , Naiki-Ito A, Watanabe K, Nagayasu Y, Hosokawa Y, Takiguchi S, Kasugai K, Kasai K, Inaguma S, Takahashi S.	PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients.	Virchows Arch	479	277-84	2021
Mori T, Tanaka H, <u>Suzuki S</u> , Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muraguruma K, <u>Wanibuchi H</u> , Ohira M.	Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer.	Cancer Sci	112	1746-57	2021
Matsuyama N, Naiki T, Naiki-Ito A, Chaya R, Kawai T, Etani T, Nagai T, <u>Kato H</u> , Kubota Y, Yasui T.	Novel case of androgen receptor-positive cancer of unknown primary without serum prostate-specific antigen elevation that became progression free in the long term after primary combined androgen blockade.	IJU Case Rep	4	59-63	2021
Matsushita K, Takasu S, Ishii Y, <u>Toyoda T</u> , Yamada T, Morikawa T, Ogawa K.	In vivo mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of gpt delta rats.	Arch Toxicol.	95	3117-31	2021

Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi M, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, <u>Totsuka Y</u> , Nambu A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabekjikul W, Paitoonpong L, Handley FG, Bernabe KG, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I.	U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim.	Virology	55	71-7	2021
Komiya M, Ishigami R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshita N, Imai T, <u>Totsuka Y</u> .	Establishment of Novel Genotoxicity Assay System Using Murine Normal Epithelial Tissue-Derived Organoids.	Front Genet.	12: 768781		2021
Kobayashi T, <u>Toyoda T</u> , Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, <u>Totsuka</u>	o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N(4)-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis.	Chem Res Toxicol.	34	912-9	2021
Kawata K, Baba A, Shiota M, <u>Wanibuchi H</u> , Baba Y.	ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca <sup>2+</sup> entry.	J Biochem.	170	483-8	2021
<u>Kato H</u> , Naiki-Ito A, <u>Suzuki S</u> , Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S.	DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer.	Carcinogenesis	42	940-50	2021

Kakehashi A, <u>Suzuki S</u> , Shiota M, Raymo N, <u>Gi M</u> , Tachibana T, Stefanov V, <u>Wanibuchi H</u> .	Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis.	Cancers (Basel)	13	3613	2021
Kakehashi A, Chariyakornkul A, <u>Suzuki S</u> , Khuangphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, <u>Gi M</u> , Wongpoomchai R, <u>Wanibuchi H</u> .	Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis.	Cancers (Basel)	13	1216	2021
Kachi K, <u>Kato H</u> , Naiki-Ito A, Komura M, Nagano-Matsu A, Naitoh I, Hayashi K, Kataoka H, Inaguma S, Takahashi S.	Anti-Allergic Drug Suppressed Pancreatic Carcinogenesis via Down-Regulation of Cellular Proliferation.	Int J Mol Sci	22		2021
Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, <u>Suzuki S</u> , Yabata H, Koizumi R, Moriyo shi H, Yazawa I.	Selective extension of cerebral vascular calcification in an autopsy case of Fahr's syndrome associated with asymptomatic hypoparathyroidism.	Neuropathology	41	387-95	2021
Isobe T, Naiki T, Naiki-Ito A, Kawai T, Etani T, Nagai T, Nozaki S, Kobayakawa Y, Iwatsuki S, Matsuyama N, <u>Kato H</u> , Kawai N, Yasui T.	Rare case of immunoglobulin G4-related disease arising in gonadal glands with long-term remission without steroid treatment: Discussion and literature review.	IJU Case Rep.	4	188-91	2021
Aoyama Y, Naiki-Ito A, Xiaochen K, Komura M, <u>Kato H</u> , Nagayasu Y, Inaguma S, Tsuda H, Tomita M, Matsuo Y, Takiguchi S, Takahashi S.	Lactoferrin Prevents Hepatic Injury and Fibrosis via the Inhibition of NF-kappaB Signaling in a Rat Non-Alcoholic Steatohepatitis Model.	Nutrients	14		2021

Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Matsuda Y, Imaida K.	Lung proliferative lesion-promoting effects of left pulmonary ligation in A/J female mice.	Pathol Int.	70	340-7	2020
Yeewa R, Naiki-Itano A, Naiki T, Katano H, Suzuki S, Chawonarin T, Takahashi S.	Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism.	Nutrients	12		2020
Uemoto Y, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Asano T, Hisada T, Nishikawa S, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Okuda K, Sugiura H, Kato H, Takahashi S, Toyama T.	Sentinel lymph node biopsy may be unnecessary for ductal carcinoma in situ of the breast that is small and diagnosed by preoperative biopsy.	Jpn J Clin Oncol	50	1364-9	2020
Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, Nakagama H.	Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane.	Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci	96	180-7	2020
Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani T.	Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-resistant bladder cancer.	Cancer Lett	479	89-99	2020

Tajima Y, <u>Toyoda T</u> , Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, <u>Totsuka Y</u> , Wakabayashi K, Miyoshi N.	Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis.	Chem Res Toxicol.	13	1907-14	2020
Suzuki S, <u>Gi M</u> , <u>Toyoda T</u> , <u>Kato H</u> , Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, <u>Wanibuchi H</u> .	Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats.	J Toxicol Pathol	33	279-85	2020
Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, <u>Kato H</u> , Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S.	Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo.	Toxicology	429	152325	2020
Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, <u>Wanibuchi H</u> , Azumi A, Honda S.	Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the association with prognosis and treatment.	PLoS One	15	e0238120	2020
Nozaki S, Naiki T, Naiki-Ito A, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, <u>Kato H</u> , Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T.	Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis.	Andrology	8	1895-906	2020
Nakano-Narusawa Y, <u>Yokohira M</u> , Yamakawa K, Saoo K, Imaida K, Matsuda Y.	Single Intratracheal Quartz Instillation Induced Chronic Inflammation and Tumorigenesis in Rat Lungs.	Sci Rep	10	6647	2020

Nakanishi H, Sawada T, Kaizaki Y, Ota R, Suzuki H, Yamamoto E, Aoki H, Eizuka M, Hasatani K, Takahashi N, Inagaki S, Ebii M, <u>Kato H</u> , Kubota E, Kataoka H, Takahashi S, Tokino T, Minamoto T, Sugai T, Sasaki Y.	Significance of gene mutations in the Wnt signaling pathway in traditional serrated adenomas of the colon and rectum.	PLoS One	15	e0229262	2020
Naiki-Ito A, Naiki T, <u>Kato H</u> , Iida K, Etani T, Nagayasu Y, <u>Suzuki S</u> , Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S.	Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer.	Carcinogenesis	41	1145-57	2020
Naiki-Ito A, <u>Kato H</u> , Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, <u>Suzuki S</u> , Inaguma S, Takahashi S.	A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats.	Arch Toxicol	94	4085-97	2020
Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeino H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, <u>Totsuka Y</u> , Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K.	Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles.	Carcinogenesis	41	368-76	2020
Mapoung S, <u>Suzuki S</u> , Fuji S, Naiki-Ito A, <u>Kato H</u> , Yaodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkringkraikul P.	Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo.	Molecules	25		2020

Kishi S, Yamakawa K, Nakano-Naruse Y, Kanie S, Hara Y, Shimoto N, Saouji K, <u>Yokohira M</u> , Imada K, Matsuda Y.	Preexisting diabetes mellitus had no effect on the no-observed-adverse-effect-level of acetaminophen in rats.	J Toxicol Sci	45	151-62	2020
Kawanishi M, Yoneda R, <u>Totsuka Y</u> , Yagi T.	Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts.	Genes Environ	42	16	2020
Kato T, Matsuo Y, Ueda G, Aoyama Y, Omi K, Hayashi Y, Imafuji H, Saenito K, Tsuboi K, Morimoto M, Ogawa R, Takahashi H, <u>Kato H</u> , Yoshida M, Naitoh I, Hayashi K, Takahashi	Epithelial cyst arising in an intrapancreatic accessory spleen: a case report of robotic surgery and review of minimally invasive treatment.	BMC Surg	20	263	2020
<u>Kato H</u> , Naiki-Ito A, Yamada T, <u>Suzuki S</u> , Yamashita Y, Inaguma S, Konno N, Wanifuchi-Endo Y, Toyama T, Takahashi S.	The standard form of CD44 as a marker for invasion of encapsulated papillary carcinoma of the breast.	Pathol Int	70	835-43	2020
Takehashi A, <u>Suzuki S</u> , Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioaka M, <u>Gi M</u> , Stefanov V, <u>Wanibuchi H</u> .	Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis.	Int J Mol Sci	21		2020
Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, <u>Suzuki S</u> , <u>Kato H</u> , Nozaki S, Nagai T, Emoto T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S.	Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway.	Cancer Sci	111	1165-79	2020

Fujioka M, <u>Suzuki S</u> , <u>Gi M</u> , Kakehas hi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, <u>Wanibuchi H</u> .	Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model.	Arch Toxicol	94	927-37	2020
--	--	--------------	----	--------	------