

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安
全性評価新規解析手法の開発研究
(25KD1002)

令和 7 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀端 克良

令和 8 (2026) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告（別添3）

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究---	1
堀端克良	

II. 分担研究報告書（別添4）

1. 化学物質の人健康に関する有害性評価における定量的発がん性評価の現状・課題の整理と各種新規解析手法の活用場面の検討-----	22
井上薫	
2. DNA損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法（DDR法）の開発（堀端担当部分）-----	35
堀端克良	
3. DNA損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法（DDR法）の開発（松田担当部分）-----	44
松田俊	
4. 第Ⅱ相薬物代謝も勘案した <i>in vitro</i> 小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究-----	49
安井学	
5. 染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の検討-----	55
石井雄二	
6. ecNGS法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発-----	64
杉山圭一、鈴木 孝昌、諸角涼介	
7. 発がん性試験と遺伝毒性試験の相互相関性の相関解析-----	69
魏民	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添5）-----82

令和7年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究

研究代表者：堀端克良

国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部

研究要旨

本研究では、発がん性定量的評価に資する情報がない化学物質の評価を迅速かつ効率的に進めるため、発がん性定量評価を可能とするような新しい指標をゲノム安全性の観点から見出し、それらを活用した評価手法を開発するとともに、新手法と既存の発がん性試験結果等との定量定性的な相関性を明らかにすることで定量的化学物質発がん性予測への適用性を検証する。そのため、本研究班では以下の分担項目に基づいて研究を進めた。分担研究項目「化学物質の人健康に関する有害性評価における定量的発がん性評価の現状・課題の整理と各種新規解析手法の活用場面の検討」については、現時点までに、化審法のためのリスク評価における発がん性の定量的評価の現状と課題を整理し、変異原性の有無に関する判断及び発がん性の定量的評価における 2 つの課題を確認した。分担研究項目「DNA 損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法（DDR 法）の開発」については、クロマチン免疫沈降法などの分子生物学的な手法で化学物質等により誘発される DNA 損傷応答反応の検出に取り組むとともに、クロマチン定量プロテオミクス法の前処理法を改良し、TK6(IVGT)細胞のエトポシド曝露により 5 種 DNA 損傷応答・修復タンパク質のクロマチン結合増加を検出した。本手法は発がん関連応答を捉える評価系として有用であることを示した。分担研究項目「第Ⅱ相薬物代謝も勘案した *in vitro* 小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究」については、ラット肝 S9 存在下でアリストロキア酸 I の *in vitro* 小核試験を実施した結果、PAPS 補充群は、非補充群よりも小核細胞の割合が統計的有意に増加した。しかし、それは十分な増加とは言えず引き続き陽性対照物質の探索を行う。分担研究項目「染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の検討」では、種々の遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質を用いて、抗 γ H2AX 抗体を用いた病理組織学的小核試験の有用性を検討した。分担研究項目「ecNGS 法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」については、ecNGS 法の用量反応性に関するデータを取得したほか、キノリン曝露ラット肝臓 FFPE を入手して次年度の検証準備を完了した。また、PacBio 社 Revio の HIFI リードや他社ショートリード機種 of PECC-seq への応用も検討した。分担研究項目「発がん性試験と遺伝毒性試験や DNA 損傷応答反応等との相互相関性解析と DDR 法等の適用検証」については、ヘテロサイクリックアミンおよびニトロソ化合物の 16 週間投与試験で得られたラット肝組織を用いて、7 種類の DDR 関連タンパク質を免疫組織化学的に解析した。その結果、 γ -H2AX 陽性細胞は高用量群で認められたものの、陽性率は低く、発がん初期の DNA 損傷応答を定量的評価指標として用いるには感度面で課題があることが示唆された。このため、DEN 誘発ラット肝発がんモデルを用いた snRNA-seq 解析を実施し、発がん過程における DDR 応答細胞集団の同定を進めている。12 週時点では、DEN 用量依存的な GST-P 陽性細胞巣の形成を確認し、snRNA-seq 解析により DEN 投与に伴い変動する細胞集団を抽出した。さらに、Gstp1 陽性前がん病変関連細胞集団および DDR 活性の上昇傾向を示す DEN 応答性細胞集団を同定した。20 週投与試験も終了しており、現在、肝腫瘍を対象とした解析に向けた準備を進めるとともに、前がん病変形成期から腫瘍形成期に至る DDR 関連細胞集団の推移を検討する予定である。

研究分担者

杉山圭一：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター ゲノム安全科学部・部長

鈴木孝昌：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター ゲノム安全科学部・主任研究官

安井学：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センターゲノム安全科学部・室長

諸角涼介：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センターゲノム安全科学部・任期付研究員

井上薫：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部・室長

石井雄二：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部・室長

松田俊：京都大学大学院工学研究科・准教授

魏民：大阪公立大学大学院医学研究科・准教授

A. 研究目的

化学物質の定量的発がん性評価は、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）等の化学物質安全対策行政上の種々のリスク評価において必要であり、遺伝毒性の定性的評価結果と発がん性試験結果に基づき有害性評価値を導出する。しかし、遺伝毒性陽性と判断され発がん性の懸念があるにもかかわらず、発がん性定量的評価に資する情報がない化学物質については、発がん性定量的評価を行うことができない。これらの評価を迅速かつ効率的に進めるために、多大

な労力等を要する発がん試験に代わる、新たな発がん性定量的評価手法の開発と確立が求められている。本研究班では、発がん性定量評価を可能とするような新しい指標をゲノム安全性の観点から見出し、それらを活用した評価手法を開発するとともに、新手法と既存の発がん性試験結果等との定量定性的な相関性を明らかにすることで定量的化学物質発がん性予測への適用性を検証するとともに、OECD テストガイドライン等へ適用させることを目指す。

特に、実際の人健康に関する有害性評価での定量的発がん性評価の現状と課題を踏まえた適切な活用場面・方法に焦点を絞りつつ（井上）、クロマチン免疫沈降法（ChIP 法）やクロマチン定量プロテオミクス法など最新の技術等を活用し、さらには生体内代謝も勘案した上でゲノム毒性発現初期反応である DNA 損傷応答や関連する分子反応等を定量定性的に捉える新手法（DDR 法）を開発し（堀端、安井、石井、松田）、また、エラー修正型次世代シーケンス手法（ecNGS 法）について、データ拡充のためホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織標本等への適用性等を検証する（杉山、鈴木、諸角）。加えて、遺伝毒性の無作用量がみられる低用量下における *in vivo* 変異原性と発がん性の用量相関関係に DNA 損傷応答等が重要な影響を与えていることから、発がん性試験と DNA 損傷応答反応等との相互相関性を明らかにするとともに、DDR 法を適用して相互の定量定性的な相関を明らかにする（魏）。研究班全体として新手法の適用性検証を踏まえ、既存の発がん性

試験等の入手可能な検体等への幅広い適用検証を試み、既存の方法と新手法との定量定性的な相関関係を明らかにするとともに、国際ガイドライン等への適用を進める（全員）。特にDDR法では曝露からゲノム毒性発現に至る経時的な解析が可能であることから、時間的検証および試験期間の短縮化も検討する（堀端、松田）。

B. 研究方法

「化学物質の人健康に関する有害性評価における定量的発がん性評価の現状・課題の整理と各種新規解析手法の活用場面の検討」（担当：井上）

有害性評価が技術ガイダンスなど明文化された文書に基づき行われている化審法の優先評価化学物質に関する発がん性の定量的評価の現状を調査し、具体的な評価事例に基づき課題を整理した。また、最近、初期リスク評価のスキーム及び詳細リスク評価の考え方が整備された室内空気濃度指針の設定のための有害性評価と、家庭用品のための有害性評価における発がん性の定量的評価の現状についても調査した。

「DNA 損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法（DDR 法）の開発」（担当：堀端・松田）

堀端担当部分では、クロマチン免疫沈降法（ChIP）とクロマチン分画ウエスタンブロット法（ChWB）を適用して DNA 損傷応答反応解析を実施した。ChIP 法では、先行研究により明らかにした「拡大希釈および終夜脱架橋」により動物組織標本を可溶化し、抗 APE1 抗体を用いる

ChIP 法に適用した。動物組織標本は従来の *in vivo* 遺伝毒性評価で実施されている *in vivo* 末梢血小核試験の投与プロトコルを参照して先行研究で作成した以下のものを使用した。C57BL/6NCrSlc マウス（8 週齢、雄、各群 3 匹）に、PBS、*N*-ethyl *N*-nitrosourea（ENU）（100、50 または 25 mg/kg 体重/回）、Ethylmethanesulfonate（EMS）（200、100 または 50 mg/kg 体重/回）または 2-Acetylaminofluorene（2-AAF）（200、100 または 50 mg/kg 体重/回）を 24 時間ごとに 2 回腹腔内投与し、最終投与後 24 時間後に肝臓および血液を採取し、肝臓は 10%中性緩衝ホルマリン液で終夜固定を行い、PBS で洗浄後に凍結保存した。血液については *in vivo* 小核試験に適用した。

ChWB 法では、パイロットスタディとして、培養細胞に紫外線照射または ENU を処理し、塩濃度の異なる可溶化バッファで細胞を可溶化し、残る不溶性画分を SDS sample buffer で可溶化したものをクロマチン画分とした。得られたそれぞれの画分において、 γ H2AX、モノユビキチン化 PCNA、APE1 または POLB を認識する抗体を使用した ChWB によりそれぞれのタンパク質の分画を解析した。

松田担当部分では、クロマチン定量プロテオミクス法を実施した。ヒトリンパ芽球由来 TK6(IVGT)細胞を所定濃度および時間のエトポシド（ETP）に曝露した後、液体窒素による凍結融解で細胞の膜を破壊した。細胞ペレットを等張液で洗浄し、遊離（クロマチンに結合していない）タンパク質を抽出除去した。ペレットを高張液で洗浄することで、クロマチンに弱く結合するタンパク質を抽出した（画分

①)。残ったペレットに2 M NaClを添加して超音波破碎処理でクロマチンを破壊後、遠心分離で上清を回収した（画分②）。各画分のタンパク質をトリクロロ酢酸沈殿法で回収した。タンパク質をデオキシコール酸ナトリウム（SDC）を含む緩衝液で再溶解し、内部標準として測定対象のペプチドに対応する安定同位体を添加した。これをジチオスレイトール及びヨードアセトアミドで還元アルキル化し、トリプシン消化を行った。固相抽出で消化物（ペプチド）を脱塩精製して5%アセトニトリルに再溶解し、高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析装置（LC-MS/MS）で、測定対象タンパク質に特異的なペプチドを定量した。LC-MS/MSには Waters 社 Xevo TQ-S を使用し、Multiple reaction monitoring モードで測定した。

「第Ⅱ相薬物代謝も勘案した *in vitro* 小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究」（担当：安井）

薬物代謝の第Ⅰ相、および第Ⅱ相代謝酵素は、遺伝毒性物質の活性化や解毒に重要な役割を担う。しかし、*in vitro* 遺伝毒性試験では第Ⅱ相代謝酵素の機能がほとんど勘案されておらず、*in vitro* と *in vivo* 試験結果のギャップを生じさせる要因の一つと考えられる。本研究では、ラット肝 S9 の第Ⅰ相および第Ⅱ相代謝酵素を機能させるため、それらの補因子を補充した *in vitro* 小核試験系を構築し、代謝酵素機能の有無で変化する DNA 損傷応答（*in vitro* 小核試験）を同定・定量し、先のギャップの原因を明らかにすることで発がん性

定量評価の予測向上に寄与する。

令和7年度は、第Ⅱ相薬物代謝酵素の硫酸転移酵素（SULT）を機能させる補因子 PAPS を補充した *in vitro* 小核試験系を構築するために、PAPS 補充、あるいは PAPS 合成系（PAPS-Generating System; PGS）を用いて小核細胞の誘発が2倍程度に増加する陽性対照物質を探索した。その候補物質として、アリストロキア酸Ⅰ（AA-I）を用いた。AA-I の発がん性は、少なくとも SULT 酵素が関与していると考えられ、AA-I の DNA 付加体を増加させることがよく知られている。実験プロトコールは OECD テストガイドライン TG-487 に従った。統計解析は、2～3回の小核試験（計3000～6000細胞当たりの小核保有細胞を計測）を実施し、t検定（有意水準5%）を行った。

「染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の検討」（担当：石井）

病理標本を用いた小核検出法の有用性を検討した。本年度は、小核で発現が報告されているタンパクを指標とした免疫組織化学染色法（IHC）による小核検出を検討した。また、これまでに構築してきた抗 γ H2AX 抗体を用いた IHC による病理組織学的肝臓小核試験（HMN assay）の有用性を確認するため、遺伝毒性肝発がん物質である 2,4-dinitrotoluene（2,4-DNT）と p-dimethylaminoazobenzene（DAB）をそれぞれ100 mg/kg体重/日、非遺伝毒性肝発がん物質である clofibrate（CFB）を400 mg/kg体重/日の用量で、F344ラットに28日間強制経口投与し、肝臓の病理組織学的検索、HMN assay および肝臓小核試験を実施した。

「ecNGS 法を用いた発がん性予測手法の
開発に資する遺伝毒性評価法の開発」（担
当：杉山、鈴木、諸角）

R7 年度は、まず *in vivo* における用量反
応性評価への ecNGS 法（ECS 解析）の適
用可能性を検証するため、既存研究にお
いて用量反応性が示されているエレミ
シンを対象とした解析を実施した。エレミ
シン投与ラット試料を用い、変異頻度お
よび変異スペクトルの用量依存性を評価
することで、ラット試料における ECS 解
析の有効性を確認する設計とした。

加えて保存組織への応用を見据え、
ecNGS 法をホルマリン固定パラフィン包
埋（FFPE）サンプルへ展開するための基
盤整備を進めた。具体的には、固定条件
や処理履歴が明確で既存の遺伝毒性デー
タ（*gpt* アッセイ等）と比較可能なサンプ
ル、あるいは作成条件が規定された試験
用サンプルを候補とし、解析目的に最も
適したサンプル条件を評価した。併せて、
PacBio 社 Revio による HIFI リードを用い
た ECS 法応用可能性をデモデータで評価
したほか、Illumina 社以外の 3 種のショ
ートリードシーケンサー（Onso、
DNBSEQ、AVITI）について原理および
データ特性を検討し、PECC-seq 性能向上
への有効性を検証した。

「発がん性試験と遺伝毒性試験や DNA 損
傷応答反応等との相互相関性解析と DDR
法等の適用検証」（担当：魏）

これまでに実施した遺伝毒性肝発がん
物質であるヘテロサイクリックアミ
ン MeIQx（0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100

ppm）、IQ（0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ppm）
およびニトロソ化合物 DEN（0, 0.0001,
0.001, 0.1, 1, 10 ppm）を 16 週間投与した試
験により得られたラット肝組織を用い、7
種類の DNA 損傷応答（DDR）関連タンパ
ク質〔 γ -H2AX、p21^{Waf1/Cip1}、MOK
（MOK protein kinase）、APE1
（Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1）、
HP1 α （Heterochromatin Protein 1 alpha）、
PHLDA3（Pleckstrin Homology-Like Domain,
Family A, Member 3）、MYBL1（MYB
proto-oncogene like 1）〕の発現を免疫組織
化学的に解析した。

さらに、新たに DEN を 0（対照群）、1、
10 および 50 ppm で飲水投与するラット肝
発がん実験を実施した。本試験では、発
がん早期である 12 週（前がん病変形成
期）および腫瘍形成期である 20 週に肝
組織および肝腫瘍を採取し、snRNA-seq 解
析を実施することで、DEN 投与に伴い変
動する細胞集団、DDR 関連分子の発現変
動を示す細胞集団、ならびに新規 DDR 関
連分子候補の同定を行った。

（倫理面への配慮）

動物を用いた実験は、所属機関におけ
る「動物実験の適正な実施に関する規定」、
わが国における「動物の保護及び管理に
関する法律」、「実験動物の飼育及び保管
等に関する基準」ならびに厚生労働省の
所管する実施機関における動物実験等の
実施に関する基本指針に準拠して行った。
加えて、試験実施機関による動物実験に
関する倫理委員会の承認を得るなど、実
験動物に対する動物愛護を配慮の上で実
施した。

C. 研究結果

「化学物質の人健康に関する有害性評価における定量的発がん性評価の現状・課題の整理と各種新規解析手法の活用場面の検討」(担当：井上)

化審法における優先評価化学物質の有害性評価では、詳細評価の優先順位付けの段階である評価Ⅰから、発がん性の定量的評価（有害性評価値の導出）を行っている。発がん性の定量的評価を行う際は、遺伝毒性（変異原性）に関する試験結果に基づき、発がん性の閾値の有無を判断することになる。そのため、一般化学物質（優先指定されていない既存化学物質）及び優先評価化学物質のための遺伝毒性評価の現状についても示し、発がん性の定量的評価に関する課題を整理した。

一般化学物質を対象とするスクリーニング評価の段階では、突然変異誘発性だけでなく、染色体異常試験や小核試験など染色体異常をエンドポイントとした試験法についても評価することとなっている。また、スクリーニング評価における発がん性評価は定性的であり、国内外の機関が公表している発がん性に係る分類結果に基づき有害性クラスを判定するに留まっている。つまり、スクリーニング評価の段階では、遺伝毒性（変異原性）の評価結果が発がん性評価に反映されることはなく、評価対象物質の遺伝毒性（突然変異誘発性及び染色体異常）の有無を判断している。

一方、スクリーニング評価の結果、優先評価化学物質に指定された物質群は、詳細評価（評価Ⅱ）の優先度判定を行う

評価Ⅰ段階に進むが、評価Ⅰにおける発がん性については、可能であれば新たに収集した既存の定量情報に基づく有害性評価値の導出を行うこととなっているため、発がん性の定量的評価にあたっては、遺伝毒性（変異原性）の評価結果に基づき発がん性の閾値の有無を判断しなければならない。この発がん性の閾値の有無の判断は、評価対象物質が直接 DNA に作用し突然変異を誘発するか（真の意味での変異原性を有するか）否かで決定されるため、基本的には「突然変異誘発性をエンドポイントとする試験結果」に基づき行われており、この判断を下す過程において、染色体異常をエンドポイントとする試験結果は、*in vivo* の試験結果であっても、その意義は低い。評価Ⅰの結果、詳細評価が必要と判断された優先評価化学物質は、評価Ⅱに進むが、この段階での遺伝毒性の評価は、評価対象物質が発がん性を有する場合、その閾値の有無を判断するため「突然変異誘発性があるか否か」を判断する目的で行われる。つまり、現行の有害性評価において、発がん性の定量的評価を行うにあたっては、「突然変異誘発性の有無」を判断できればよい状況となっている。また、評価Ⅰ及び評価Ⅱにおける発がん性の定量的評価では、閾値の有無に応じて有害性評価値の導出方法が異なるため、「突然変異誘発性の有無」を明確に判断できることが、非常に重要になる

評価Ⅰ及び評価Ⅱにおける実際の評価結果を調査し、突然変異誘発性及び発がん性の閾値の有無の判断における課題を抽出することを試みた結果、2つの課題を抽出した。

①変異原性を有することが確認された

ものの、発がん性の定量的評価に資する有害性情報がないために、発がん性の定量的評価ができないこと。

②変異原性の有無を明確に判断できる遺伝毒性試験結果がない場合、発がん性の閾値の有無（発がん性の有害性評価値導出方法）の決定が困難であること。

その他、室内空気濃度指針設定や家庭用品のための有害性評価においても、上記①及び②の課題に直面する可能性があり、状況としては化審法と同様であると考えた。

「DNA 損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法（DDR 法）の開発」（担当：堀端・松田）

堀端担当部分の ChIP 法では、2-AAF 以外の投与群の解析が終了した。*in vivo* 小核試験では陽性であったが、ChIP 法では先行研究で実施した培養細胞を用いる ChIP 法と比較し、%Input 値自体が著しく低く、また、各群の%Input 値に統計学的有意差が見られなかった。

ChWB 法では、紫外線照射後のクロマチン画分において、照射後の培養時間依存的な γ H2AX の増加が検出された。モノユビキチン化 PCNA も同様に、照射後の培養時間依存的な増加が検出された。モノユビキチン化 PCNA は、可溶化画分、特に生理的塩濃度での可溶化画分（150 mM NaCl の可溶化画分）においてもクロマチン画分と同様の結果であった。150 mM NaCl の可溶化画分中、APE1 と POLB はともに ENU 処理の有無に関わらず、検出量に変化は見られなかった。生理的塩濃度での不溶化画分に高塩濃度バッファーを処理して得られる可溶化画分では、APE1 と

POLB はともに ENU 処理後 4 時間で検出量の増大が見られ、24 時間経過後も残存した。クロマチン画分においても同様の結果が得られた。

松田担当部分であるクロマチン定量プロテオミクス法では、使用する培養細胞として TK6(IVGT)細胞を、遺伝毒性発がん物質としてトポイソメラーゼ II 阻害剤 ETP を選択した。まず用量設定のために細胞毒性試験を行い、24 h 曝露で生細胞密度が陰性対照の半分となる濃度 (IC_{50} : 0.115 μ M) を求めた。次に、TK6(IVGT)細胞を IC_{50} の ETP に曝露した後、5 種類の DNA 損傷応答及び修復タンパク質のクロマチン画分中存在量の経時変化を最長 24 h まで測定した。DNA 損傷のバイオマーカーとして知られる γ H2AX (H2AX の S139 リン酸化体) は、曝露 3 h 以降から検出され、24 h まで経時的に増加した。DNA 損傷応答タンパク質について、MDC1 のクロマチン結合量は曝露 1 h から増加してほぼプラトーに達し (0 h 比で最大 4.6 倍)、53BP1 は曝露 1 h から増加し、曝露 24 h で最大 (同 54.9 倍) となった。DNA 二本鎖切断修復を担う RAD50 及び XRCC6 のクロマチン結合量は曝露 1 h から増加し、RAD50 は曝露 6 h で最大 (同 3.9 倍) となり、XRCC6 は曝露 24 h まで経時的に増加した (同 157.1 倍)。一方、H2AX (未リン酸化体) のクロマチン中存在量に 2 倍以上の変動は見られなかった。

「第II相薬物代謝も勘案した *in vitro* 小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究」（担当：安井）

In vitro 小核試験の用量設定試験は、AA-

I を DMSO に溶解させ、2 mg/mL を最高用量として公比 3 で実験を行った。最終濃度 222 µg/mL 以上で析出が観察された。OECD テストガイドラインに推奨されている細胞毒性指標として RPD を用いた。RPD 値が 45±5% となる最適用量が 222 µg/mL であることが分かった。しかし、300 µM PAPS を補充する予備実験において、非補充群よりも補充群の細胞毒性が増強されることが判明したため、PRD 値が 50 ±5% 程度を最適用量として用量設定試験を行った。その結果、AA-I の最適用量は 64.1~94.1 µg/mL の範囲が良好であることが分かった。

PAPS 補充、あるいは PGS 補充した *in vitro* 小核試験の本試験を実施した結果、PAPS 補充実験では、あまり有意な差が観察できなかったが、PGS 補充実験では非補充群より補充群のほうが、74.1 µg/mL 以上の複数の用量群で統計的有意差が得られた（約 45.2% の増加）。

「染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の検討」（担当：石井）

invitrogen 社製抗 cGAS 抗体（PA5-141097 及び PA5-121188）及び抗 POLQ 抗体（PA5-115130）を用いて、IHC による小核の検出を検討した。その結果、抗 cGAS 抗体では良好な染色像は得られず、抗 POLQ 抗体では一部の小核が陽性を呈したものの、陰性の小核も認められた。抗 γH2AX 抗体を用いた HMN assay の有用性評価では、2,4-DNT、DAB 及び CFB を、100、100 及び 400 mg/kg 体重/日の用量で F344 ラットに 28 日間強制経口投与した。その結果、全ての投与群において、投与一週目から体重増加抑制が見られ、最

終体重は全ての投与群で対照群に比して有意な低値を示した。剖検の結果、肝実重量は CFB 群において、肝比重量は全て投与群で有意に上昇した。肝臓の病理組織学的検索では、2,4-DNT 群において、卵円形細胞の過形成、空胞変性及び単細胞壊死の増加が、CFB 群において肝細胞肥大及び顆粒状変性が見られた。HMN assay では、2,4-DNT 及び DAB 群において肝臓の小核含有細胞（MNHEP）の有意な上昇が認められたのに対して、肝臓小核試験では、全ての投与群において MNHEPs の頻度が上昇した。

「ecNGS 法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」（担当：杉山、鈴木、諸角）

R7 年度は、まず *in vivo* における用量反応性評価への ECS 解析の有用性を検証した。過去の研究において用量反応性が示されているエレミシン投与ラット試料を用いて ECS 解析を行った結果、エレミシン投与群において変異頻度は用量依存的に増加することが確認された。また、エレミシンに特徴的とされる T>A および T>C の変異スペクトルについても、用量反応性が認められた。これらの結果から、ECS 解析がラット試料における *in vivo* 変異原性評価に有用である可能性が示唆された。

さらに次年度に ecNGS 法を FFPE サンプルへ適用するための実験体制を整備した。キノリン曝露 *gpt delta* ラット肝臓 FFPE（3 用量＋対照）が提供され、用量反応評価および *gpt* アッセイとの比較を可能とする基盤が確立した。また、抽出条件比較に用いる別ロット FFPE も確保した。さら採

用する ecNGS 手法として長鎖リード技術では、PacBio 社 Revio の HIFI リードが ECS 法に有用である可能性を検討し、初期設定変更により相補鎖ごとのコンセンサス配列等が取得可能であることをデモデータで確認した。ショートリードでは、PECC-seq 性能向上を目的に複数機種を評価し、AVITI について適応可能性を検討中である。

「発がん性試験と遺伝毒性試験や DNA 損傷応答反応等との相互相関性解析と DDR 法等の適用検証」(担当：魏)

MeIQx、IQ および DEN を 16 週間投与したラット肝組織において、7 種類の DDR 関連タンパク質の発現を免疫組織化学的に解析した結果、 γ -H2AX などの陽性細胞は、MeIQx (100 ppm)、IQ (100 ppm) および DEN (10 ppm) の高用量群において認められた。しかしながら、いずれの物質においても陽性率が低く、DNA 損傷応答反応を定量的評価指標として適用するには限界があることが示唆された。なお、他の DDR 関連タンパク質については本研究の検討条件下で明確な陽性像は認められなかった。

DEN 誘発ラット肝発がん試験については、12 週投与実験を終了し、DEN 用量依存的な GST-P 陽性細胞巢形成を確認した。10 ppm 群では 10 細胞以上からなる GST-P 陽性細胞巢が認められ、50 ppm 群では肝実質の大部分が GST-P 陽性を示した。さらに、対照群および 50 ppm DEN 投与群の 12 週時点肝組織を用いた snRNA-seq 解析により、対照群と DEN 投与群との間で UMAP 上のクラスター分布に明らかな差

異が認められ、DEN 投与に伴い変動する複数の細胞集団が抽出された。DEN 投与群では、Gstp1 陽性前がん病変関連細胞集団および DDR 活性の上昇傾向を示す DEN 応答性細胞集団が同定された。20 週投与試験も終了しており、現在、肝腫瘍サンプルを対象とした snRNA-seq 解析に向けて準備を進めている。

D. 考察

「化学物質の人健康に関する有害性評価における定量的発がん性評価の現状・課題の整理と各種新規解析手法の活用場面の検討」(担当：井上)

化審法、室内空気濃度指針、家庭用品のためのリスク評価における発がん性の定量的評価の現状と課題を整理した結果、前項に示した通り、2 つの課題があることを確認することができた。

①及び②の課題を解決するには、理想的には OECD テストガイドラインに準拠したトランスジェニックげっ歯類の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験、または発がん性試験を追加で実施することが望ましい。しかしながら、既存物質を対象とした評価の場合、動物実験の追加実施（特に発がん性試験）は動物愛護やコストの面で現実的ではない。したがって、本研究事業により、遺伝毒性（変異原性）に関する新たな解析方法を確立し、遺伝毒性（変異原性）の観点から、発がん性試験データがなくても半定量的（強/中/弱）あるいは定量的（有害性評価値）に「発がん性の強さ」を見積もることを可能にする手法を確立することの重要性が高いと考える。

本検討では、発がん性の定量的評価の現状を踏まえ、変異原性に着目した。しかしながら、発がん性機序の中には、突然変異誘発性以外の各種遺伝毒性関連イベントが関与することが知られる。また、発がん性を有することが明らかな化学物質に定量的評価に資する発がん試験データがなければ有害性評価値を導出することができないことは、変異原性の有無に関係なく共通の課題となる。本研究事業は、発がん性に関与する可能性がある各種遺伝毒性関連イベント（DNA 損傷応答、染色体不安定性、代謝活性化依存的な遺伝毒性、次世代シーケンスにより検出される変異頻度・変異スペクトル等）に着目して取り組んでいるが、これらのイベントと発がん性の定量性との相関性を明らかにし、新たな評価手法を確立することは、「発がん性の定量的評価に資するデータ取得」が可能な環境の基盤整備につながると考えた。

「DNA 損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法（DDR 法）の開発」（担当：堀端・松田）

堀端担当部分の ChIP 法では、培養細胞を用いた先行研究で得られる %Input 値と比較し、動物標本を用いた ChIP 法での %Input 値は著しく低いため、可溶化の際の終夜脱架橋により DNA 損傷応答解析の標的である DNA 損傷応答タンパク質がクロマチン画分から遊離している可能性が考えられた。組織標本のように長時間強くホルマリン架橋されたサンプルを ChIP 法に適用できる組織標本可溶化条件を見出すのは非常に困難である。

ChWB 法では、 γ H2AX、モノユビキチ

ン化 PCNA、APE1 および POLB において、DNA 損傷依存的な DNA 損傷応答が観察された。これらの結果は紫外線照射およびアルキル化剤によって誘発されるクロマチン画分上の DNA 損傷応答反応をこの方法で検出できることを示している。特に、突然変異を誘発する主要因であると考えられている DNA 損傷応答反応の一つとして知られる損傷乗り越え DNA 合成には PCNA のモノユビキチン化反応が非常に重要であることが知られていることから、今回得られた結果は非常に有望であると考えられる。

松田担当部分であるクロマチン定量プロテオミクス法では、既報（松田ら, *Genes Environ.* 45:37 2023）の前処理法を改変した。具体的にはトリプシン消化に用いるタンパク質変性剤を尿素から SDC に変更し、尿素に起因する副反応（タンパク質の N 末端や側鎖のアミノ基のカルバミル化）を抑制した。さらに、ゲノム DNA 断片化を DNase I 添加による消化から超音波破碎に変更し、夾雑成分を低減した。本研究では ETP 曝露により、TK6(IVGT)細胞中の γ H2AX 含め各種 DNA 損傷応答・修復タンパク質のクロマチン結合量が増加した一方、これらの変動はタンパク質によって異なることを明らかにした。ETP の血漿タンパク質結合率（94%）に基づけば、標準用量（100 mg/m²）の投与患者の遊離体血中最大濃度は約 1 - 2 μ M であり、血中終末半減期 6 - 18 h を考慮する（IARC Monographs Vol.76）と、本研究で採用した濃度（0.115 μ M）はヒトで実際に到達しうる条件であると考えられる。現在さらなる低用量域におけ

る、ETP とクロマチン画分中各種 DNA 損傷応答及び修復タンパク質の用量応答を測定中である。さらに他の DNA 損傷応答・修復タンパク質や、細胞周期制御やヒストン修飾など、測定対象の拡大も進めており、これにより多様なメカニズムを有する遺伝毒性発がん物質の発がん性評価に貢献できる可能性がある。

「第II相薬物代謝も勘案した *in vitro* 小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究」(担当：安井)

PAPS試薬では不十分だが、PGS系を用いることにより、ラットS9中に含まれるSULTの機能を十分に利用した*in vitro*小核試験を実施できることが分かった。*In vitro*試験の最大のメリットは、早く安価に化学的な作用機序を明確化できることである。本研究においては、*in vitro*でPAPS合成を行えるPGS補充による小核試験において、もし、PGS補充で陽性、PGS非補充で陰性となった場合、PGSの有無だけで陽性陰性に違いが示されるため、その被験物質は、SULTのPAPS抱合化によって、遺伝毒性が活性化（陽性）したことを証明できる。単に*in vitro*試験で陽性になっただけでなく、代謝酵素機能の有無で変化するDNA損傷応答の原因が明らかになることで発がん性の定量性の予測向上、およびその作用機序も理解することができる。

AA-Iの発がんには、少なくともSULTの関与が明らかとされている (Sidorenko et al. *Carcinogenesis*.35, 1814-22 (2014) ; Hashimoto et al. *Carcinogenesis* 37, 647-55 (2016); Arlt et al. *Arch Toxicol.* 91, 1957-75 (2017))。今回、PGS 補充した *in vitro* 小核

試験でも遺伝毒性が活性化されたことが確認でき、既報と一致したため、現段階において、本実験系は有用であると考えられた。

「染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の検討」(担当：石井)

抗 cGAS 抗体及び抗 POLQ 抗体による小核の検出を検討したが、いずれも良好な染色性は見られず、従来の抗 γ H2AX 抗体を用いた IHC が小核の検出に有効であることが確認された。遺伝毒性及び非遺伝毒性肝発がん物質を用いた HMN assay の有用性評価では、2,4-DNT 及び DAB 投与群において両試験で小核含有肝細胞頻度の有意な増加が認められ、CFB 投与群で変化がみられなかったことから、本法は遺伝毒性肝発がん物質の検出が可能であるのに対し、一部の非遺伝毒性肝発がん物質は検出できない可能性が示唆された。また、CFB 投与群では肝臓小核試験の結果と相違が見られたが、肝臓小核試験では細胞増殖細胞の増加が認められなかったことから、前処理過程における細胞破壊とそれに伴うアーティファクトが生じていることが示唆された。それ故、本試験の結果については再現性の確認が必要と考えられた。

「ecNGS 法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」(担当：杉山、鈴木、諸角)

R7年度は主として ecNGS 法の *in vivo* 用量反応性評価に対する有効性検証と、FFPE サンプルへの展開に向けた基盤整備を行った。エレミシン投与ラット試料に

において、変異頻度および特異的な変異スペクトル (T>A、T>C) が用量依存的に増加したことは、ECS 解析が生体内における変異原性を定量的に捉え得ることを示す重要な知見である。特に、既存の遺伝毒性知見と整合する結果が得られたことから、本手法が発がん性評価に資する指標として機能する可能性が示唆された。

一方、FFPE サンプルでは、ホルマリン固定に伴う架橋構造や人工的塩基修飾に起因するシークエンスエラーが大きな課題となる。本年度は、こうした制約を踏まえた技術的整理を行い、比較可能な FFPE サンプル確保および解析条件検討の方向性を明確化した。今後、抽出法や前処理条件の最適化を通じてアーティファクトを低減できれば、保存試料を活用した遺伝毒性評価の適用範囲が大きく拡張されると期待される。また、PacBio HiFi リードの活用により、従来法では困難であった解析への展開も視野に入る。

「発がん性試験と遺伝毒性試験や DNA 損傷応答反応等との相互相関性解析と DDR 法等の適用検証」(担当：魏)

本研究で免疫組織化学的に検討した DDR 関連タンパク質の多くは、これまでの mRNA 発現解析により同定された分子であり、mRNA マーカーとしては十分な感度を有する一方で、免疫組織化学的手法による可視化タンパク質マーカーとしては、十分な感度が得られないことが示唆された。また、本研究における γ -H2AX の免疫組織化学的解析の結果から、発がん初期における DNA 損傷応答は、肝臓内の特定の少数細胞集団に限局して生じている可能性が示

唆され、細胞集団レベルで DDR 応答を解析する必要性が考えられた。そこで、DEN 誘発ラット肝発がんモデルを用いて snRNA-seq 解析を実施した。

そこで、DEN 誘発ラット肝発がんモデルを用いて snRNA-seq 解析を実施したところ、12 週時点の肝組織において、DEN 投与に伴い変動する細胞集団が抽出され、さらに Gstp1 陽性前がん病変関連細胞集団および DDR 活性の上昇傾向を示す DEN 応答性細胞集団が同定された。これらの結果から、snRNA-seq を用いた細胞集団別解析は、発がん初期の DDR 応答細胞集団の同定、および発がん性予測に有用な新規 DDR 関連遺伝子候補の探索に有用である可能性が示された。20 週投与試験も終了しており、今後、肝腫瘍を対象とした解析を進め、12 週の前がん病変形成期サンプルとの統合解析により、発がん進展過程で維持または増強される DDR 関連細胞集団および新規 DDR マーカー候補の検証を行う予定である。

E. 結論

「化学物質の人健康に関する有害性評価における定量的発がん性評価の現状・課題の整理と各種新規解析手法の活用場面の検討」(担当：井上)

本検討では、化審法、室内空気濃度指針、家庭用品のためのリスク評価における発がん性の定量的評価の現状と課題を整理した。その結果、変異原性の有無を明確に判断できる遺伝毒性情報が不足する場合には発がん性の閾値の有無の決定が困難であること、また、変異原性が確認されても発がん性の定量的評価に資する有害性情報が不足する場合には定量的

評価ができないことが明らかとなった。これらの課題に対応するためには、変異原性のみならず、DNA 損傷応答、染色体不安定性、代謝活性化依存的な遺伝毒性、次世代シーケンスにより検出される変異頻度・変異スペクトル等の各種遺伝毒性関連イベントに着目し、それらと発がん性の定量性との相関性を明らかにすることが重要である。本研究事業でこれらの評価手法を確立することにより、発がん性試験データが不足する化学物質についても、発がん性の強さを半定量的又は定量的に見積もるための基盤整備につながると考えられた。

「DNA 損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法（DDR 法）の開発」（担当：堀端・松田）

堀端担当部分の ChIP 法では、組織標本可溶化の際の終夜脱架橋により DNA 損傷応答解析の標的である DNA 損傷応答タンパク質がクロマチン画分から遊離している可能性が考えられた。組織標本のように長時間強くホルマリン架橋されたサンプルを ChIP 法に適用できる組織標本可溶化条件を見出すのは非常に困難である。

ChWB 法では、DNA 損傷依存的な DNA 損傷応答、特にモノユビキチン化 PCNA のクロマチン画分への分画が観察された。これらの結果は紫外線照射およびアルキル化剤によって誘発されるクロマチン画分上の DNA 損傷応答反応をこの方法で検出できることを示している。DNA 損傷応答は *in vivo* および *in vitro* は遺伝毒性につながる重要な指標であるため、これらの DNA 損傷応答検出システムは *in vivo* と *in vitro* の両方の遺伝毒性評価に適用できる

可能性がある。

松田担当部分であるクロマチン定量プロテオミクス法では、前処理法を改良し、処理中の副反応（タンパク質の N 末端や側鎖のアミノ基のカルバミル化）の抑制、試料に添加する夾雑物の低減を行った。確立した手法の概念実証のために、TK6(IVGT)細胞と遺伝毒性発がん物質 ETP を用いた曝露実験を実施した。ETP 曝露によりクロマチン画分中の DNA 損傷応答・修復タンパク質 (γ H2AX、MDC1、53BP1、RAD50、XRCC6) が増加したことを確認し、これらタンパク質のクロマチン結合量の増加が発がん性評価の指標となり得ることを示した。IARC 資料に基づく ETP の臨床用量における遊離体の血漿中最大濃度 ($1-2 \mu\text{M}$) 及び血中終末半減期 ($6-18 \text{ h}$) を考慮すると、本研究で採用した曝露濃度 ($0.115 \mu\text{M}$) は、臨床用量で実際に到達し得る ETP 濃度域に相当し、この実際的な濃度条件下で生じるクロマチン結合タンパク質の変動を捉えた点において、生物学的に妥当な発がん関連応答の評価系であることを示している。

「第II相薬物代謝も勘案した *in vitro* 小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究」（担当：安井）

ラット肝 S9 存在下の条件で、SULT の補因子 PAPS を合成する系を *in vitro* 小核試験に補完することによって、PGS 補充型の *in vitro* 小核試験系をほぼ構築できたと考えられた。一方、そのための陽性対照物質が必要であるが、非補充群に対して、補充群が約 2 倍程度の小核細胞数を誘発させられる陽性対照物質を見つけることが

できていない。より多くの小核細胞数を誘発させる強い遺伝毒性化学物質を引き続き探索したいと考えている。

「染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の検討」（担当：石井）

免疫組織化学染色に病理切片における小核の検出には、抗 γ H2AX抗体が有効であることを明らかにした。また、HMN assayは2,4-DNT及びDABのような遺伝毒性肝発がん物質を検出可能であり、肝発がん性評価法として有用であることが示された。一方、CFBでは明らかな変化は認められず、一部の非遺伝毒性肝発がん物質は検出できない可能性が示唆された。今後さらなる検討を行い、本法の適用範囲と限界を明らかにする必要があると考えられた。

「ecNGS法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」（担当：杉山、鈴木、諸角）

R7年度において、まず *in vivo* 用量反応性評価に対する ECS 解析の有効性を検証し、加えて FFPE サンプルへの展開に向けた研究基盤を整備した。過去の研究において用量反応性が示されているエレミン投与ラット試料に対する ECS 解析により、変異頻度および特異的な変異スペクトルが用量依存的に変化することが確認され、本手法がラット試料における変異原性を定量的に評価し得る可能性が示された。

これらの知見を踏まえ、保存試料を対象とした応用展開として、キノリン曝露 *gpt delta* ラット肝臓 FFPE サンプルおよび検討用 FFPE 試料を確保し、次年度に予定

する DNA 抽出条件の比較試験やライブラリ調製条件最適化に向けた体制を構築した。以上より、本年度は、ecNGS 法を用いた *in vivo* 遺伝毒性評価の有効性を示すとともに、FFPE サンプルでの本格的解析に向けた基盤整備を完了した。今後は、R8年度における FFPE 由来 DNA 特性の定量評価および解析条件の最適化を経て、R9年度の ecNGS 法による FFPE 解析と発がん性予測手法としての妥当性検証へと展開する計画である。

「発がん性試験と遺伝毒性試験や DNA 損傷応答反応等との相互相関性解析と DDR 法等の適用検証」（担当：魏）

ヘテロサイクリックアミンおよびニトロソ化合物の16週間投与試験で得られたラット肝組織を用い、既知の7種類のDDR関連タンパク質発現を免疫組織化学的に解析した結果、発がん初期におけるDNA損傷応答を定量的に評価するには、感度面で一定の課題があることが示唆された。一方、DEN誘発ラット肝発がんモデルを用いたsnRNA-seqによる細胞集団別解析により、発がん初期のDDR応答細胞集団の同定が可能であり、発がん性予測に資する新規DDR関連遺伝子候補の探索にも有用である可能性が示された。今後、12週および20週サンプルの統合解析と、研究班内で開発されるDDR関連分子の検証を通じて、定量的発がん性評価に資するDDRマーカー候補の確立を目指す。

本研究班では、発がん性の定量的評価に資する情報が不足している化学物質を対象に、既存の変異原性試験（Ames 試験等）を前提としつつ、それらを補完する

新規ゲノム安全性評価指標の探索および検証を目的として、複数の分担研究を実施した。各分担研究は、DNA 損傷応答、染色体不安定性、変異原性の用量反応解析、代謝を考慮した遺伝毒性評価など、発がん過程の異なる段階や側面を捉えるものであり、相互に補完的な関係にある。

本年度の検討を通じて、単一の指標のみで発がん性を定量的に評価することには限界がある一方で、複数のゲノム安全性指標について、それぞれの有用性、適用範囲および限界を整理することで、行政評価における活用可能性を段階的に検討できることが示された。本研究の最終的な到達点としては、これらの知見を統合し、行政評価においてどのような場面で、どのように活用可能であることを示す評価の考え方および科学的知見として体系的に取りまとめることを想定している。

一方で、新規試験法や評価手法をガイドラインとして位置づけるためには、再現性や妥当性に関する十分なデータの蓄積に加え、国内外の専門家間での合意形成が不可欠であり、通常は複数年にわたる検討と国際的な議論を要する。そのため、本研究期間内にガイドライン策定そのものを完了することを目的とするのではなく、将来的な試験法や評価手法の検討・高度化、あるいはガイドライン検討に資する科学的根拠および技術的整理を提示することを重要な成果として位置づけている。

今後は、各分担研究により得られた成果を基に、既存の発がん性試験結果や遺伝毒性試験結果との関係性を整理し、行政評価における位置づけや活用可能性を

より明確化することで、発がん性評価の高度化に資する基盤的知見の集積を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Morozumi R, Shimizu N, Amimoto T, Yamamoto J, Tsuda M. A chemical labeling method for selective conjugation to DNA 3'-phosphoglycolate termini. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2026. doi:10.1080/15257770.2026.2645371.
2. Inoue K, Hirabayashi Y, Azuma A. Detailed hazard assessment of ethylbenzene to establish an indoor air quality guideline in Japan. *Environ. Health. Prev. Med*. 2025. 30: 34.
3. Matsumoto M, Natsume M, Iso T, Umamo T, Murata Y, Masumura K, Horibata K, Sugiyama KI. Increased mutagenicity in the liver of MutaMouse females following oral treatment with commercial-grade toluene diisocyanate. *Genes Environ*. 2025;47:12.
4. Hotani T, Goto M, Otsuki Y, Matsuda S, Wada N, Shinohara M, Matsuda T, Yokoi M, Sugawara K, Ohsaki Y, Sakai W. Dynamics of Fanconi anemia protein D2 in association with nuclear lipid droplet formation. *J Cell Sci*. 138(21):jcs264430, 2025
5. Mitsumoto T., Ishii Y, Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Toyoda T., Ogawa

- K. Evaluation of 2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramide by a comprehensive toxicity study using gpt delta rats. *Toxicol. Appl. Pharm.* 507, 117686 (2026)
6. Takimoto N., Ishii Y., Mitsumoto T., Takasu S., Namiki M., Toyoda T., Shibutani M., Ogawa K. Involvement of nuclear atrophy of binucleated hepatocytes in the large micronucleus formation induced by rat hepatocarcinogen acetamide. *Toxicol. Appl. Pharm.* 496, 117243 (2025).
7. Application of error-corrected sequencing technologies for in vivo regulatory mutagenicity assessment. Yauk CL, Lynch AM, Dobrovolsky VN, Schuler M, Smith-Roe SL, Fitzgerald D, Higgins J, Honarvar N, Le Curieux F, Matsumura S, Minocherhomji S, Recio L, Salk JJ, Sugiyama KI, Suzuki T, Wills JW, Marchetti F. *Regul Toxicol Pharmacol.* 164, 1059 (2026)
8. Honda H, Suzuki T, Kitajima M, Kondo NI, Miyata K, Utsumi S, Yamada M. The new era shaped by environmental genome monitoring - symposium of the Japanese environmental mutagen and genome society (JEMS), 2024. *Genes Environ.* 2025, 47: 6.
9. Matsumura S, Hosoi S, Hirose T, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Kawade A, Hakura A, Kakiuchi D, Asakura S, Koyama N, Okada Y, Chikura S, Kimoto T, Masumura K, Suzuki T, Sugiyama KI. Whole genome mutagenicity evaluation using Hawk-Seq™ demonstrates high inter-laboratory reproducibility and concordance with the transgenic rodent gene mutation assay. *Genes Environ.* 2025, 47: 13.
10. Error-corrected next generation sequencing (ecNGS) の現状. 鈴木孝昌. 毒性質問箱27号, 50-55 (2025)
11. Maeda-Tateishi, T, Nagata, Y, Imanishi, Y, Hirakawa, T, Tan, SS, Emoto, M, Gi M. Evaluation of tumor clonality with chemical carcinogenesis in a mouse model of visualized X chromosome inactivation. *J Toxicol Pathol.* 2026; 39(1): 31-38.
12. Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Ogawa K, Gi M, Naiki-Ito A, Abdallah S, Tsuda H. Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment. *J Appl Toxicol.* 2026; 46(4): 1232-1245.
13. Gi M, Suzuki S, Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander WT, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Noura I, Kakehashi A, Xie XL, Tsuruoka S, Hirose A, Naiki-Ito A, Tsuda H, Wanibuchi H. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways. *Nanomaterials* (Basel). 2025; 15(23).
14. Vachiraarunwong A, Fujioka M, Alexander DB, Suzuki S, Guo R, Qiu G, Kawamura Y, Shibano K, Noura I, Praseatsook K, Akane H, Takasu S, Tsuda H, Ogawa K, Wanibuchi H, Gi M. Developing a novel in

- vitro toxicity assay for predicting inhalation toxicity in rats. *Toxicol Lett.* 2026; 415: 111803.
15. Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, Takase H, Taquahashi Y, Hojo M, Maeno A, Fukamachi K, Gi M, Hirose A, Tsuruoka S, Takahashi S, Tsuda H, Naiki-Ito A. Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs. *Nanomaterials* (Basel). 2025; 15(18).
 16. Guo R, Gi M, Kiyono T, Vachiraarunwong A, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Praseatsook K, Kawamura Y, Kakehashi A, Noura I, Xie X, Wanibuchi H. Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in Toxicity Assessment of Arsenicals. *Toxics*. 2025; 13(10).
 17. Turner MC, Godderis L, Guenel P, Hopf N, Quintanilla-Vega B, Soares-Lima SC, Chaiklieng S, Da Silva J, Fustinoni S, Gi M, Heck JE, Huaux F, Johanson G, Kirkeleit J, Kirsanov K, Richiardi L, Teixeira JP, Terron A, Topinka J, White MC, Benbrahim-Tallaa L, Facchin C, Kunzmann A, Madia F, Pasqual E, Wedekind R, Deng X, Suonio E, Viegas S, Barry A, Dolatkhah R, Dongoran RA, Gonzalez-Gil EM, Onyije FM, Mattock H, de Conti A, Schubauer-Berigan MK. Carcinogenicity of automotive gasoline and some oxygenated gasoline additives. *Lancet Oncol.* 2025; 26 (5): 548-549.
 18. Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J Toxicol Pathol.* 2025; 38(1): 59-67.
 19. Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Taya S, Setthaya P, Sato K, Wanibuchi H, Wongpoomchai R, Dejkriengkraikul P, Gi M, Yodkeree S. Anticancer and Antioxidant Effects of Bioactive Peptides from Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*). *Nutrients*. 2025; 17(4).
 20. Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Sato K, Dissook S, Wanibuchi H, Taya S, Wongpoomchai R, Dejkriengkraikul P, Gi M, Yodkeeree S. Chemopreventive Effects of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae Protein Hydrolysates in a Rat Model of Early-Stage Colorectal Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2025; 26(13).
 21. Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J Toxicol Pathol.* 2025; 38(2): 147-154.
 22. Nakano M, Gi M, Toyooka T, Suzuki S, Wanibuchi H, Takebayashi T. Occupational health topics series on the effects of chemicals: epidemiological and toxicological risk assessments of ortho-toluidine for bladder cancer. *J Occup Health.* 2025; 67(1).
 23. Kakehashi A, Suzuki S, Nishidoi Y,

- Hagihara A, Ikenaga H, Shiota M, Qiu G, Noura I, Kuwae Y, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Gi M, Kawada N, Wanibuchi H. The Impact of Peroxiredoxin 3 on Molecular Testing, Diagnosis, and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers* (Basel). 2025; 17(13).
24. Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38(2): 161-165.
- G.2. 学会発表**
1. 井上薫：有害性評価での科学的に適切な adverse effects 判断に向けて，第 52 回日本毒性学会学術集会，那覇（2025.7）
 2. 井上薫・田原麻衣子・河上強志：家庭用品に使用されるポリヘキサメチレンビグアナイドの長期影響に関する有害性評価，第 62 回全国衛生化学技術協議会年会，高崎（2025.11）
 3. 増村健一，安東朋子，堀端克良，石井雄二，杉山圭一：マウスを用いたアクリルアミドの in vivo 変異原性と次世代に誘発される生殖細胞系列突然変異の解析．第 52 回日本毒性学会学術年会（2025.7）
 4. 吉田愛海，江田侑未，杉山圭一，堀端克良：遺伝情報発現に付随する突然変異誘発と細胞周期の影響．日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（2025.11）
 5. 江田侑未，佐々木沙耶，吉田愛海，杉山圭一，堀端克良：クロマチン画分上の DNA 損傷応答解析を利用した遺伝毒性反応の検出．日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（2025.11）
 6. 松本真理子，磯貴子，馬野高昭，大道友香，広瀬望，若山美智子，増村健一，堀端克良，杉山圭一：グリシジルメタクリレート経口投与による雄 MutaMouse における in vivo 変異原性の検討．日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（2025.11）
 7. 羽倉昌志，須井哉，川上久美子，加藤雅之，皿田巳子，杉山圭一，堀端克良，峯川和之，山本美佳，山田雅巳：TA100 株の感受性の違いについての一考察（BMS pilot study）．日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（2025.11）
 8. グルーズピーター，山田雅巳，堀端克良，杉山圭一：AlkB と触媒活性を欠損した DNA ポリメラーゼ IV が Ames 試験で hisG46 標的の変異誘発に及ぼす影響．日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（2025.11）
 9. 安井学，鵜飼明子，本間正充，杉山圭一；Ames 試験で強い陽性を示す香料物質 6-メトキシキノリンのグルタチオン補充型 TK6 試験によるフォローアップ．日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会，静岡市（2025.11）
 10. M Han, T Matsuda, S Matsuda, Biotransformation of orexin receptor antagonists in activated sludge, 9th International Symposium of the Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society (Kyoto) (2025.12)
 11. S Oka, T Matsuda, S Matsuda, Proposal of

- a quantitative chromatin proteomics-based method for assessing chemical carcinogenicity, 9th International Symposium of the Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society (Kyoto) (2025.12)
12. S Matsuda, Visualization and absolute quantification of the DNA damage responses for chemical genotoxicity assessment, The National Cheng Kung University–Kyoto University Research Exchange Forum: Sustainability and Disaster Prevention (Tainan, Taiwan) (2025.12)
 13. 岡辰太郎、松田知成、松田俊、クロマチン定量プロテオミクス法による化学物質発がん性判別法の提案、日本環境変異原ゲノム学会第54回大会（静岡）（2025.11）
 14. 溝口夏生、松田知成、松田俊、遺伝子治療用ウイルスベクターの環境リスク評価ーメダカ胚細胞を用いたベクターの感染能評価ー、日本環境変異原ゲノム学会第54回大会（静岡）（2025.11）
 15. 吉野純、松田知成、松田俊、遺伝子治療に用いられるアデノ随伴ウイルスベクターのメダカに対する感染リスクの *in vitro* 評価、日本環境変異原ゲノム学会第54回大会（静岡）（2025.11）
 16. 吉野純、松田知成、松田俊、遺伝子治療に用いられるアデノ随伴ウイルスベクターのメダカに対する感染リスクの *in vitro* 評価、京都大学環境衛生工学研究会第47回シンポジウム（京都）（2025.7）
 17. 岡辰太郎、松田知成、松田俊、石川良賀、岡めぐみ、ディーゼル排気微粒子が誘導する突然変異パターンとDNA付加体の解析、京都大学環境衛生工学研究会第47回シンポジウム（京都）（2025.7）
 18. 石井雄二、瀧本憲史、山上洋平、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、渋谷 淳、小川久美子：ラットを用いたカルバミン酸メチルの *in vivo* 遺伝毒性評価。日本食品化学学会第31回総会・学術大会、滋賀（2025.6）
 19. 山上洋平、石井雄二、中村賢志、原島洋文、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、村上智亮、小川久美子：アセトアミド誘発ラット肝腫瘍で見られた染色体外環状DNAの特徴とクロモスリプシスの関与。第52回日本毒性学会学術年会、沖縄（2025.7）
 20. 石井雄二：クロモスリプシスによるラット肝発がん機序の解明。がん予防学術大会2025、名古屋（2025.9）
 21. 相馬 明玲、石井 雄二、山上 洋平、高須 伸二、豊田 武士、小川 久美子：アセトアミドの大型小核形成に関わる構造的特徴の検討。第52回日本毒性学会学術年会、沖縄（2025.7）
 22. 山上洋平、石井雄二、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、村上智亮、小川久美子：アセトアミド誘発大型小核によるクロモスリプシス様染色体再構成と肝発がんへの寄与。第54回日本環境変異原ゲノム学会、静岡（2025.11）
 23. 山上洋平、石井雄二、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、村上智亮、小川久美子：アセトアミドのラット肝発がんに寄与する肝細胞質内封入体の形成機構。第

- 42 回日本毒性病理学会, 名古屋 (2026.1)
24. 石井雄二, 山上洋平, 高須伸二, 相馬明玲, 豊田武士, 小川久美子: Acetamide のラット肝発がんに寄与する大型小核の形成機序. 日本薬学会第146年会, 大阪 (2026. 3)
 25. 鈴木孝昌, 三島雅之, 笠原杏奈, 最上由香里, 高橋華奈子, 佐藤薫, 杉山圭一. ナノポアシークエンサーを用いた簡便迅速なDNAメチル化解析. 日本環境変異原ゲノム学会第54回大会 (2025.11)
 26. 鈴木 孝昌, 三島 雅之, 佐藤 薫, 杉山 圭一, 動物細胞を用いたDNAメチル化検出法の検討, 日本農芸化学会 2026年度大会, 京都市 (2026.3)
 27. 最上 由香里, 高橋 華奈子, 鈴木 孝昌, 伊澤 和輝, 三島 雅之, 柳井 修一, 堀端克良, 小泉 修一, 杉山 圭一, 佐藤 薫, 神経細胞、ミクログリアにおける細胞老化にともなうゲノム変化と表現系の解析, 日本薬理学会第99回年会, 仙台市 (2026.3)
 28. 伊澤和輝, 津田雅貴, 諸角涼介, 杉山圭二. ラットサンプルを用いたECS解析による用量反応性の検討. 日本環境変異原ゲノム学会第54回大会 (2025.11)
 29. 諸角涼介, 清水直登, 石庭寛子, 井出博, 津田雅貴. ネットアイツメガエルを用いた低線量率放射線によるDNA修復機構依存的影響の解析」日本環境変異原ゲノム学会第54回大会 (2025.11)
 30. Ryosuke Morozumi, Naoto Shimizu, Hiroko Ishiniwa, Hiroshi Ide, Masataka Tsuda. Radiation sensitivity dependent on DSB repair mechanism in *Xenopus* embryos. The 68th Annual Meeting of the Japanese Radiation Research (2025.10)
 31. Arpamas Vachiraarunwong, 魏民, 藤岡正喜, 鈴木周五, 邱桂鈺, 郭潤傑, 野浦郁恵, 梯アンナ, Kwanchanok Praseatsook, 鰐渕英機. ラットの急性吸入毒性を予測する新規*in vitro*毒性試験系の開発. 第52回日本毒性学会学術年会, 沖縄 (2025.7)
 32. Arpamas Vachiraarunwong, Kwanchanok Praseatsook, Rawiwan Wongpoomchai, Shugo Suzuki, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi, Supachai Yodkeree, Min Gi. Chemopreventive Potential of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae. がん予防学術大会2025, 名古屋 (2025.9)
 33. 郭潤傑, Arpamas Vachiraarunwong, 鈴木周五, 藤岡正喜, Guiyu Qiu, 河村百合菜, 梯アンナ, 鰐渕英機, 魏民. DMH 投与ラットにおける大腸発がん初期の遺伝子発現変動. 第 84 回日本癌学会学術総会, 石川 (2025.9)
 34. Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Kawamura Yurina, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Structure-Dependent Hepatotoxicity and Carcinogenic Potential of PFASs in Immortalized Human Liver Cells. 第 84 回日本癌学会学術総会, 石川 (2025.9)
 35. 邱桂鈺, 魏民, 鈴木周五, 藤岡正喜, 梯アンナ, ワシラアルンウオン アルパマス, 野浦郁恵, 郭潤傑, 鰐渕英機. 有機

ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露によるラット海馬に及ぼす影響. メタルバイオサイエンス研究会 2025, 東京 (2025.9)

36. 鈴木周五, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 鰐渕英機. 動物モデルを用いた職業性膀胱がんの研究について. 第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 大阪 (2025.10)

37. 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、Vachiraarunwong Arpamas、野浦郁恵、邱桂鈺、河村百合菜、大石裕司、山口貴嗣、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸の経胎盤ばく露による次世代雄性マウスにおける肝発がん機序の検討. 第 30 回ヒ素シンポジウム, 大阪 (2025.12)

H. 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

令和7年度 厚生労働科学研究費 補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
分担研究課題名:化学物質の人健康に関する有害性評価における定量的発がん性評価の
現状・課題の整理と各種新規解析手法の活用場面の検討

研究分担者：井上 薫
所属 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター
安全性予測評価部 第一室 室長

研究要旨

本分担研究では、化審法や家庭用品規制法、室内濃度指針値設定等のためのリスク評価において、発がん性の定量的評価の現状を調査し、具体的評価事例に基づき課題を整理した。化審法のための発がん性の定量的評価の現状調査の結果、変異原性の有無に応じて発がん性の定量的評価が行われていることを確認した。また、評価事例に基づき以下の2つの課題を抽出した。①変異原性を有することが確認されたものの、発がん性の定量的評価に資する有害性情報がないために、発がん性の定量的評価ができないこと。②変異原性の有無を明確に判断できる遺伝毒性試験結果がない場合、発がん性の閾値の有無（発がん性の有害性評価値導出方法）の決定が困難であること。また、室内空気濃度指針や家庭用品のための評価においても、化審法と同様の課題に直面する可能性があることを確認した。これらの課題を解決するには、理想的にはOECD テストガイドラインに準拠したトランスジェニックげっ歯類の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験、または発がん性試験を追加で実施することが望ましいが、既存物質の場合、動物実験の追加実施（特に発がん性試験）は現実的ではない。また、発がん性を有することが明らかな化学物質に定量的評価に資する発がん試験データがなければ有害性評価値を導出することができないことは、変異原性の有無に関係なく共通の課題となる。これらの課題に対応するためには、変異原性のみならず、発がん性に関与する可能性がある各種遺伝毒性関連イベント（DNA 損傷応答、染色体不安定性、代謝活性化依存的な遺伝毒性、次世代シーケンスにより検出される変異頻度・変異スペクトル等）に着目し、それらと発がん性の定量性との相関性を明らかにすることが重要である。本研究事業により新たな評価手法の確立を試みることは、発がん性試験データが不足する化学物質の発がん性の強さを半定量的又は定量的に見積もるための基盤整備につながると考えられた。

A. 研究目的

化学物質の定量的発がん性評価は、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）等の化学物質安全対策行政上の種々のリスク評価において必要であり、遺伝毒性の定性的評価結果と発がん性試験結果に基づき有害性評価値を導出する。しかし、実際の化審法のための有害性評価の現場では、遺伝毒性（変異原性）陽性（あるいは陽性である可能性がある）と判断され、化学物質（あるいはその代謝物）が直接 DNA に作用し、突然変異を誘発することにより発がん性を発揮する懸念があるにもかかわらず、妥当な発がん性試験情報が無いなど定量的評価に資する情報がない場合は、評価対象物質について発がん性の定量的評価（有害性評価値の導出）を行うことができない。

本研究班では、発がん性定量評価を可能とするような新しい指標をゲノム安全性の観点から見出し、それらを活用した評価手法を開発するとともに、新手法と既存の発がん性試験結果等との定量定性的な相関性を明らかにすることで定量的化学物質発がん性予測への適用性を検証することを目的としている。新たな評価手法の定量的化学物質発がん性予測への適用性を検証するには、まずは、化審法等のための有害性評価における発がん性の定量的評価における現状と課題を把握する必要がある。

そこで、本分担研究では、化審法や「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」（家庭用品規制法）、室内濃度指針値設定等のためのリスク評価において、発がん性の定量的評価の現状を調査し、具体的評価事例に基づき課題を整

理した。

B. 研究方法

分担研究者は、化審法における既存化学物質の人健康に関する有害性評価のための評価案作成を業務としている。また、家庭用品や室内空気濃度指針設定のための有害性評価案の作成も行っている。

まずは、有害性評価が技術ガイダンスなど明文化された文書に基づき行われている化審法の優先評価化学物質に関する発がん性の定量的評価の現状を調査し、具体的な評価事例に基づき課題を整理した。また、最近、初期リスク評価のスキーム及び詳細リスク評価の考え方が整備された室内空気濃度指針の設定のための有害性評価と、家庭用品のための有害性評価における発がん性の定量的評価の現状についても調査した。

C. 研究結果

1. 化審法

化審法における優先評価化学物質の有害性評価では、詳細評価の優先順位付けの段階である評価Ⅰから、発がん性の定量的評価（有害性評価値の導出）を行っている。後述の通り、発がん性の定量的評価を行う際は、遺伝毒性（変異原性）に関する試験結果に基づき、発がん性の閾値の有無を判断することになる。そのため、本報告では、一般化学物質（優先指定されていない既存化学物質）及び優先評価化学物質のための遺伝毒性評価の現状についても示し、発がん性の定量的評価に関する課題を整理した。

1) 化審法における既存化学物質の遺伝毒性評価

スクリーニング評価手法の詳細（案）
（平成 22 年 10 月 8 日：
https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/information/ra/screening_detail.pdf）によると、化審法では、「被験物質の遺伝毒性、がん原性を予測すること」を目的に遺伝毒性（変異原性）を評価する。また、化審法では、変異原性試験として、細菌を用いる復帰突然変異試験（以下、Ames 試験）及びほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（以下、染色体異常試験）又はマウスリンフォーマ TK 試験が、長期毒性（がん原性及び次世代への遺伝的影響）のスクリーニング毒性試験として位置づけられている。Ames 試験、染色体異常試験、マウスリンフォーマ試験を合わせて「変異原性試験」と呼び、最低でもこれらの試験結果（陽性または陰性）があれば、スクリーニング評価での遺伝毒性評価を完了することができる（注：化審法では、染色体異常をエンドポイントとする試験についても「変異原性試験」と呼ぶことに留意が必要）。

既存化学物質のうち、一般化学物質を対象とするスクリーニング評価の段階では、信頼性が担保された情報源（国内外の評価機関が公表している評価書等）から得られる *in vitro*, *in vivo* 試験結果（上記の「変異原性試験」以外の試験法の結果についても対象とする：後述）を網羅的に収集し、表 1 に示す判断基準に基づき有害性クラスを付す。評価対象とする試験法は、上記の「変異原性試験」のほか、表 2 に示した試験法も含まれるが、

突然変異誘発性だけでなく、染色体異常試験や小核試験など染色体異常をエンドポイントとした試験法についても評価することとなっている。また、前述の通り、化審法では「被験物質の遺伝毒性、がん原性を予測すること」を目的に遺伝毒性（変異原性）を評価することになっているが、スクリーニング評価における発がん性評価は定性的であり、表 3 に示す国内外の機関が公表している発がん性に係る分類結果に基づき有害性クラスを判定するに留まっている。つまり、スクリーニング評価の段階では、遺伝毒性（変異原性）の評価結果が発がん性評価に反映されることはなく、評価対象物質の遺伝毒性（突然変異誘発性及び染色体異常）の有無を判断している。

スクリーニング評価の結果、優先評価化学物質に指定された物質群は、詳細評価（評価Ⅱ）の優先度判定を行う評価Ⅰ段階に進む。評価Ⅰでの遺伝毒性（変異原性）評価は、スクリーニングと同様の方法、考え方で行う。ただし、評価Ⅰにおける発がん性については、定性的な分類情報を整理するとともに、可能であれば新たに収集した既存の定量情報に基づく有害性評価値の導出を行うこととなっているため、発がん性試験（OECD テストガイドライン 451）または慢性毒性／発がん性併合試験（OECD テストガイドライン 453）に関する情報があれば収集し、有害性評価値の導出を行う。発がん性の定量的評価にあたっては、遺伝毒性（変異原性）の評価結果に基づき発がん性の閾値の有無を判断しなければならない。

この発がん性の閾値の有無の判断は、評価対象物質が直接 DNA に作用し突然変異を誘発するか（真の意味での変異原性

を有するか) 否かで決定される。実際の評価Ⅰでは、遺伝毒性に関する評価結果が「Ames 試験 及び/または 何らかの *in vivo* 試験が陽性」であった場合に暫定的に「閾値なし」と判断し、必要に応じて変異原性試験の条件や結果の妥当性を精査した上で最終判断する。この段階での閾値の有無の判断は、閾値の有無を明確にするというよりは、明らかに閾値がない、あるいは閾値がないと確認できない物質を選別することを目的とし、閾値の有無の判断が困難な場合は、専門家判断によることとしている（化審法における優先評価化学物質に関する リスク評価の技術ガイダンス II. 人健康影響に関する 有害性評価 Ver. 1.2 参照：https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/information/ra/02_tech_guidance_ii_hitoyuugaisei_v_1_2.pdf）。実際の評価Ⅰでの発がん性の閾値有無の判断は、分担研究者を中心として国立衛研・安全性予測評価部第一室が担当し、判断が困難だった場合は、部内の遺伝毒性専門家が総合判断した。暫定的な閾値の有無の判断基準に基づき「発がん性に閾値なし」と判断した物質については、Ames 試験のみ陽性だったケースや、Ames 試験の陽性結果以外に、*in vitro* または *in vivo* の突然変異誘発性をエンドポイントとする試験（例：Hprt 試験, gpt アッセイ）の陽性結果があるケース、Ames 試験は陰性だったが TG 試験が陽性だったケースが含まれていた。また、Ames 試験が陽性であっても gpt アッセイなど *in vivo* の突然変異を検出する試験で陰性であった場合は、「発がん性に閾値あり」と判断したケースがあった。このように、評価Ⅰでの発がん性の閾値有無の

判断は、基本的には「突然変異誘発性をエンドポイントとする試験結果」に基づき行われており、この判断を下す過程において、染色体異常をエンドポイントとする試験結果は、*in vivo* の試験結果であっても、その意義は低い。

評価Ⅰの結果、詳細評価が必要と判断された優先評価化学物質は、評価Ⅱに進む。詳細評価の場合である評価Ⅱでの遺伝毒性の評価は、国内外のリスク評価機関による遺伝毒性の判断結果を参考にしつつ、評価対象物質に関する全ての遺伝毒性試験の結果を精査し、その結果に基づき総合判断する。この総合判断では、発がん性の有無に関わらず「評価対象物質に遺伝毒性があるか否か」を判断することと、発がん性を有する場合にその閾値の有無を判断するため「評価対象物質に突然変異誘発性があるか否か」という2つの目的がある。前者の目的の場合は、染色体異常等を含めて評価・判断するが、後者の目的に場合は、基本的には「突然変異誘発性」に着目して評価・判断する。つまり、現行の有害性評価において、発がん性の定量的評価を行うにあたっては、「突然変異誘発性の有無」を判断できればよい状況となっている。

2) 化審法における発がん性の定量的評価

化審法では、発がん性の定量的評価は、優先評価化学物質を対象とする評価Ⅰ及び評価Ⅱの段階で行う。このとき、前述の「化審法における優先評価化学物質に関するリスク評価の技術ガイダンス」第Ⅱ章 人健康影響の有害性評価 Ver.1.2【2022年7月】に示された方法に従い、

発がん性の有害性評価値を導出する。

評価Ⅰにおける発がん性については、定性的な分類情報を整理するとともに、可能であれば新たに収集した既存の定量情報に基づく有害性評価値の導出を行うこととなっているため、発がん性試験（OECD テストガイドライン 451）または慢性毒性／発がん性併合試験（OECD テストガイドライン 453）に関する情報があれば収集し、有害性評価値の導出を行う。

前項に示した通り、遺伝毒性試験結果に基づき発がん性は閾値ありと判断された場合、入手できた発がん性試験情報から得た発がん性に関する無毒性量（NOAEL）または最小毒性量（LOAEL）を不確実係数積（種差 10、個体差 10、重篤度（発がん性）10。LOAEL 採用の場合は、追加で 10）で除して有害性評価値を算出する。発がん性試験情報がない、あるいは発がん性情報はあるが、最高用量でも発がん性が認められない等、発がん性を評価するには情報が不足している場合は、発がん性の定量的評価が困難であるため、「情報なし」とする。

一方、発がん性は閾値なし（あるいは閾値がないと確認できない）と判断された場合、原則として、内外の評価機関が導出している発がん性に関する定量情報あるいは発がん性試験結果（ユニットリスク（UR）、スロープファクター（SF）、50%発がん用量（TD₅₀）、Benchmark Dose Lower Confidence Limit（BMDL）、NOAEL）を基点として 10⁻⁵の発がんリスクレベル相当の有害性評価値を求める。ただし、発がん性試験結果の情報が無い等の理由により発がん性の定量的評価が困難な場合は、暫定的に発がん影響に対

する毒性学的懸念の閾値 TTC 1.5 µg/person/day (=0.00003 mg/kg/day)を発がん性評価値として扱う。

評価Ⅱにおける発がん性の定量的評価は、発がん性に関する情報（ヒトを対象とした疫学研究結果を含む）を精査後、キースタディーを選定し、発がん性の閾値の有無の判断結果に応じて有害性評価値を暴露経路毎（経口・吸入）に導出する。有害性評価値の導出については、閾値ありの場合、発がん性の NOAEL、BMDL 等を不確実係数積で除して算出する。閾値なしの場合は、原則として、発がん性試験データから独自に計算して得られる BMDL₁₀ 等を用いて、UR 又は SF を求め、さらに 10⁻⁵ 相当の発がんリスクレベルを求める。

このように、評価Ⅰ、評価Ⅱいずれにおいても、発がん性の定量的評価においては、閾値の有無に応じて有害性評価値の導出方法が異なるため、「突然変異誘発性の有無」を明確に判断できることが、非常に重要になる。

3) 評価事例に基づく課題の抽出

評価Ⅰ及び評価Ⅱにおける遺伝毒性、発がん性の評価方法は前項までに示した通りであるが、実際の評価では、得られた毒性情報の量や質により、評価対象物質に関する突然変異誘発性の有無、発がん性の有無や用量反応関係を明確に判断できない場合がある。そこで、本検討では、実際の評価結果を調査し、突然変異誘発性及び発がん性の閾値の有無の判断における課題を抽出することを試みた。

評価Ⅰでは、変異原性があると判断されたものの、発がん性の定量的評価に資する有害性情報がなかったために、発が

ん性の有害性評価値として TTC 0.00003 mg/kg/day を暫定的に採用している物質がある（硫酸ジメチル、クレオソート油）。

硫酸ジメチルの遺伝毒性は、*in vitro* 試験では Ames 試験、染色体異常試験等、多くが陽性、*in vivo* 試験では、マウス及びラットを用いた優性致死試験以外は小核、染色体異常、DNA 損傷、マウススポットテストなどが陽性であることから、変異原性陽性（発がん性閾値無し）と判断した。発がん性については、マウスやラットを用いた長期間投与試験結果を得ることができたものの、いずれも発がん性を検索するには十分な投与期間ではなかったこと、試験によっては、1 群当たりの動物数が十分でなかったこと等の理由で、いずれも発がん性の定量的評価に資する試験情報ではなかった。

クレオソート油の遺伝毒性は、Ames 試験および *in vivo* 小核試験の陽性結果が得られている。クレオソート油は、多環芳香族炭化水素 (PAH) を 80-85% 含有しており、PAH の中には変異原性を有するものがあることから、評価Ⅰでは変異原性あり（発がん性閾値なし）」と判断した。発がん性については、化審法では経口及び吸入経路の暴露を想定して有害性評価を行うが、経皮暴露の試験情報しかなかったため、経口及び経皮経路の発がん性について定量的評価を行うことができなかった。

このような「変異原性を有することが確認されたものの発がん性について定量的評価ができない」状況については、先行研究立ち上げのきっかけとなった課題であり、未だ解決方法は見い出されていない。

評価Ⅰ及び評価Ⅱでは、評価対象物質

に変異原性の有無を明確に判断できる試験結果が無く、発がん性の閾値の有無（発がん性の有害性評価値導出方法）の決定が困難だったケース（例：スチレン、アクリロニトリル、1, 4-ジオキサン）があった。

評価Ⅰ対象であるスチレンについて、当初の遺伝毒性評価では、本物質にそのものに突然変異誘発性はないが、主要代謝物である Styrene-7,8-oxide により突然変異誘発性含む遺伝毒性が発揮されると推察されたことから、発がん性は「閾値なし」として評価していた。しかし、その後、突然変異誘発性の有無を決定づける試験（トランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験 (OECD テストガイドライン 488 準拠)）が器具・容器包装のために実施されたため、その結果 (Murata et al., 2023) に基づき変異原性の有無の判断が可能となった (*in vivo* 変異原性陰性、発がん性は閾値ありに変更)。このように、テストガイドラインに準拠した *in vivo* 遺伝子突然変異試験を追加的に実施できれば、突然変異誘発性については判断することが可能となり、発がん性の定量的評価方法を決めることができる。しかし、評価Ⅰ及び評価Ⅱのために、この試験を実施するための仕組みはない。

評価Ⅱ対象であるアクリロニトリルの遺伝毒性については、トランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異試験の情報があり、陰性結果が得られていたものの、「げっ歯類動物では多くの *in vivo* 試験で陰性を示すが、バクテリアを用いた復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ細胞を用いた遺伝子突然変異試験、チャイニーズハムスターの培養細胞を用いた染色体異常試験等では、一部陰性結果が

混在しているものの、多くの *in vitro* 試験で陽性であること、また職業暴露したヒトに染色体異常の誘発が観察された報告があることから、変異原性は低いものの、変異原性が無いと言える確証はない。」と判断していた。また、発がん性の定量的評価（有害性評価値導出）は、「閾値あり」の場合と「閾値なしの場合」の両方の値を試算し、「閾値なし」の方が低値だったため、「閾値なし」の値を発がん性の有害性評価値として採用していた。変異原性の判断に至るまでの専門家による議論の内容は十分に確認できない状況だが、得られた試験結果から変異原性を容易に判断することが困難であったことが推察される。

評価Ⅱ対象である 1,4-ジオキサンについては、エンドポイントに関わらず *in vitro*, *in vivo* 試験（Ames 試験、Pig-a assay 含む）のほとんどが陰性だったが、*in vivo* 突然変異誘発性試験である gpt assay で陽性結果があったことから、その結果の解釈について専門家間で議論となった。最終的に、他の研究報告や遺伝毒性試験の結果に基づき総合判断した結果、研究目的で実施された gpt assay の陽性結果は、DNA 付加体の生成に代表される酸化ストレスに起因する二次的な遺伝毒性と推測することが可能であり、本物質が直接的な遺伝毒性（変異原性）を示すものではないと判断し、発がん性については「閾値あり」として有害性評価値が導出された。このケースは、突然変異誘発性の有無を決定づける gpt assay が、テストガイドラインに準拠して実施されたものではなかったため、最高用量のみの陽性結果の解釈のために、関連する研究報告や他の試験結果等の精査に基づく考

察が必要で、突然変異誘発性の判断（発がん性の閾値の有無の判断）までに時間を要した。このように、行政のための有害性評価に資する試験結果が得られなかった場合、発がん性の閾値の有無を決定づけるのが難しい。

以上の化審法のための発がん性の定量的評価の現状調査の結果、2つの課題を抽出した。

①変異原性を有することが確認されたものの、発がん性の定量的評価に資する有害性情報がないために、発がん性の定量的評価ができないこと。

②変異原性の有無を明確に判断できる遺伝毒性試験結果がない場合、発がん性の閾値の有無（発がん性の有害性評価値導出方法）の決定が困難であること。

2. 室内空気濃度指針

室内空気濃度指針について検討するシックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会では、令和5年度に「初期リスク評価の考え方」
(<https://www.mhlw.go.jp/content/11121000/001187635.pdf>) 及び「詳細リスク評価の考え方」

(<https://www.mhlw.go.jp/content/11121000/001210977.pdf>) を整備した。

「初期リスク評価の考え方」によると、初期リスク評価における発がん性の評価は、化審法の評価Ⅰに準じて行うこととされている。また、「詳細リスク評価の考え方」によると、詳細リスク評価における発がん性評価は、閾値の有無に応じて有害性評価値を求めることとされており、明記されていないが、その考え方や方法は化審法の評価Ⅱと同様であった。

令和5年度に開催された前述の検討会において、2-エチル-1-ヘキサノール、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレートの初期リスク評価及びエチルベンゼンの詳細リスク評価が実施されたが、いずれの評価対象物質についても、入手できた遺伝毒性試験の結果から「遺伝毒性（変異原性）なし」と判断されたため、発がん性の有害性評価値導出が可能だったケース（2-エチル-1-ヘキサノール、エチルベンゼン）については、閾値の有無の判断については問題とならなかった。なお、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレートについては、定量的評価（ヒト及び動物）に関する有害性情報がなかったため、有害性評価値導出は行っていなかった。

以上の通り、室内空気濃度指針値設定のための最近のリスク評価においては、発がん性の定量的評価において問題となるケースはなかったが、今後の評価においては、評価対象物質が化審法における既存物質に相当するものであるため、前述の化審法の事例に基づくものと同様の課題①及び②に直面する可能性は大にある。

3. 家庭用品

家庭用品については、家庭用品安全対策調査会において、検討対象物質選定スキームにより選定された9物質について長期影響の詳細評価を行うこととなった。そのため、分担研究者が他の研究事業でその有害性評価案の作成を行っている。家庭用品については、調査会にて長期影

響の有害性評価の考え方等が定まっていない状況であるが、化審法における詳細評価（評価Ⅱ）と同じ方法で評価案作成を進めている。令和7年度までに、9物質中3物質の有害性評価案を作成したが、そのうちポリヘキサメチレンビグアナイドの評価案については、得られた遺伝毒性試験の結果から、変異原性を含む遺伝毒性の懸念はない（発がん性は閾値あり）と判断したものの、本物質は殺菌剤として使用されていることから、細菌を用いたAmes試験の陰性結果は信頼性が低い可能性があり、遺伝毒性の専門家の客観的な評価が必要な状況である。これは、変異原性の有無を明確に判断できる遺伝毒性試験結果がないケースであり、化審法における課題②に相当する。今後、評価対象物質の範囲を拡大すれば、化審法における課題①に相当するケースも出てくる可能性があり、状況としては、化審法と同様であると考えた。

D. 考察

本検討では、本研究事業により開発を試みている新たな定量的化学物質発がん性予測手法の、行政のための有害性評価への適用性を今後検証する必要があるため、化審法や家庭用品規制法、室内濃度指針値設定等のための有害性評価における発がん性の定量的評価の現状を調査し、具体的評価事例に基づき課題を整理した。現状では、変異原性（突然変異誘発性）の有無に基づき発がん性の閾値の有無を判断するため、遺伝毒性の評価の現状についても調査し、課題を整理した。その結果、前述の通り、2つの課題があると考えた。

①変異原性を有することが確認されたものの、発がん性の定量的評価に資する有害性情報がないために、発がん性の定量的評価ができないこと。

②変異原性の有無を明確に判断できる遺伝毒性試験結果がない場合、発がん性の閾値の有無（発がん性の有害性評価値導出方法）の決定が困難であること。

①及び②の課題を解決するには、理想的には OECD テストガイドラインに準拠したトランスジェニックげっ歯類の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験、または発がん性試験を追加で実施することが望ましい。しかしながら、既存物質を対象とした評価の場合、動物実験の追加実施（特に発がん性試験）は動物愛護やコストの面で現実的ではない。したがって、本研究事業により、遺伝毒性（変異原性）に関する新たな解析方法を確立し、遺伝毒性（変異原性）の観点から、発がん性試験データがなくても半定量的（強/中/弱）あるいは定量的（有害性評価値）に「発がん性の強さ」を見積もることを可能にする手法を確立することの重要性が高いと考える。

本検討では、発がん性の定量的評価の現状を踏まえ、変異原性に着目した。しかしながら、発がん性機序の中には、突然変異誘発性以外の各種遺伝毒性関連イベントが関与することが知られる。また、発がん性を有することが明らかな化学物質に定量的評価に資する発がん試験データがなければ有害性評価値を導出することができないことは、変異原性の有無に関係なく共通の課題となる。本研究事業は、発がん性に関与する可能性がある各種遺伝毒性関連イベント（DNA 損傷応答、染色体不安定性、代謝活性化依存的な遺

伝毒性、次世代シーケンスにより検出される変異頻度・変異スペクトル等）に着目して取り組んでいるが、これらのイベントと発がん性の定量性との相関性を明らかにし、新たな評価手法を確立することは、「発がん性の定量的評価に資するデータ取得」が可能な環境の基盤整備につながると考えた。

E. 結論

本検討では、化審法、室内空気濃度指針、家庭用品のためのリスク評価における発がん性の定量的評価の現状と課題を整理した。その結果、変異原性の有無を明確に判断できる遺伝毒性情報が不足する場合には発がん性の閾値の有無の決定が困難であること、また、変異原性が確認されても発がん性の定量的評価に資する有害性情報が不足する場合には定量的評価ができないことが明らかとなった。これらの課題に対応するためには、変異原性のみならず、DNA 損傷応答、染色体不安定性、代謝活性化依存的な遺伝毒性、次世代シーケンスにより検出される変異頻度・変異スペクトル等の各種遺伝毒性関連イベントに着目し、それらと発がん性の定量性との相関性を明らかにすることが重要である。本研究事業でこれらの評価手法を確立することにより、発がん性試験データが不足する化学物質についても、発がん性の強さを半定量的又は定量的に見積もるための基盤整備につながると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

Inoue K, Hirabayashi Y, Azuma A. Detailed hazard assessment of ethylbenzene to establish an indoor air quality guideline in Japan. Environ. Health. Prev. Med. 2025. 30: 34.

G.2. 学会発表

井上薫：有害性評価での科学的に妥当な adverse effects 判断に向けて，第 52 回日本毒性学会学術集会，那覇，2025 年 7 月 4 日

井上薫・田原麻衣子・河上強志：家庭用品に使用されるポリヘキサメチレンビグアナイドの長期影響に関する有害性評価，第 62 回全国衛生化学技術協議会年会，高崎，2025 年 11 月 7 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別添 4

表 1. 変異原性の有害性クラス

(スクリーニング評価手法の詳細 (案) 図表 1-6 より抜粋)

有害性クラス	1	2	3	4	クラス外
指標	GHS 区分 1 A	以下のいずれか ・ GHS 区 分 1B, 2 ・ 化審法判定 における強い陽性 ・ 化管法の変異原性クラス 1 ・ 強弱不明の陽性結果	化審法の変異原性試験のいずれも陽性 ※1	化審法の変異原性試験のいずれかで陽性 ※1	以下のいずれか ・ GHS 区分外 ・ 化審法の変異原性試験のいずれも陰性 ・ in vivo 試験で陰性※2

※1 強い陽性及び軽微な陽性は除く。

※2 in vitro の変異原性試験で陽性の結果がある場合、「クラス外」とするかは個別に専門家判断。

別添 4

表 2. 変異原性に関する収集する試験法の範囲（[]内は化審法の通知試験名）
 (化審法における人健康影響に関する有害性データの信頼性評価等について【改訂第 2 版】
 図表 7 より抜粋)

化審法 の通知 試験	分類	試験法	試験法（英語）	OECD Test Guideline No.	【参考】 GHS 分 類基礎 試験*
○	<i>in vitro</i>	細菌復帰突然変異試験 【細菌を用いる復帰突然変異試験】	Bacterial Reverse Mutation Test	TG 471	⑥
○		哺乳類の <i>in vitro</i> 染色体異常試験	In Vitro Mammalian	TG 473	⑥
		験 【哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験】	Chromosomal Aberration Test	(2014)	
			In vitro Mammalian Chromosome Aberration	TG 473 (1997)	
		Hprt 遺伝子と xprt 遺伝子を用いる哺乳類細胞の <i>in vitro</i> 遺伝子突然変異試験	In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes	TG 476 (2015)	⑥
		<i>in vitro</i> 哺乳類細胞小核試験	In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test	TG 487 (2014)	
○		チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の <i>in vitro</i> 遺伝子突然変異試験	In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene	TG 490 (2015)	
○	<i>in vivo</i>	哺乳類赤血球小核試験 【げっ歯類を用いる小核試験】	Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test	TG 474	③
		哺乳類骨髓染色体異常試験	Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test	TG 475	③
		げっ歯類を用いる優性致死試験	Rodent Dominant Lethal Test	TG 478	①
		哺乳類の精原細胞を用いる染色体異常試験	Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test	TG 483	②
		哺乳類肝細胞を用いる <i>in vivo</i> 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験	Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells <i>in vivo</i>	TG 486	⑤
		トランスジェニックげっ歯類の体細胞および生殖細胞を用いた変異原性試験	Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays	TG 488	②、③

*) GHS 分類の基礎となる試験データの種別

- ①生殖細胞を用いる *in vivo* 経世代変異原性試験
- ②生殖細胞を用いる *in vivo* 変異原性試験
- ③体細胞を用いる *in vivo* 変異原性試験
- ④生殖細胞を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験
- ⑤体細胞を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験
- ⑥*in vitro* 変異原性試験

別添 4

表 3. 発がん性の有害性クラス

(スクリーニング評価手法の詳細 (案) 図表 1-8 より抜粋)

有害性クラス	1	2		クラス外	(有害性クラスを付与しない)
GHS の区分	1A	1B	区分 2	区分外	区分できない
IARC	1	2A	2B	4	3
産業衛生学会	1	2A	2B		
ACGIH	A1	A2	A3	A5	A4
EPA 1986	A	B1/ B2	C	E	D
EPA 1996	K/L			NL	CBD
EPA 2005	CaH	L	S	NL	I
NTP	K	R			
EU	1	2	3		

令和7年度 厚生労働科学研究費 補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
**分担研究課題名:DNA損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法
 (DDR法)の開発(堀端担当部分)**

研究分担者：堀端克良

国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部

研究要旨

化学物質の遺伝毒性評価結果は発がん性評価における重要な指標であるが、既存の遺伝毒性試験は、遺伝子突然変異、小核形成、染色体異常等の比較的下流のエンドポイントを検出するものが中心であり、曝露後早期に生じるDNA損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉えることは困難である。本分担研究では、DNA損傷応答反応をクロマチン上の分子応答として検出する新手法、すなわちDDR法の開発を目的として、クロマチン免疫沈降法（ChIP法）およびクロマチン分画ウエスタンブロット法（ChWB法）の検討を行った。ChIP法では、昨年度までの先行研究で見出した「拡大希釈および終夜脱架橋」による固定組織可溶化条件を用いて、ENU、EMS等を投与したマウス肝臓組織標本を解析した。その結果、培養細胞を用いたChIP法と比較して%Input値が著しく低く、投与群間の明確な有意差を検出するには至らなかった。これは、長時間ホルマリン固定された組織標本では、可溶化・脱架橋過程によりDNA損傷応答タンパク質がクロマチン画分から遊離し、検出感度が低下する可能性を示すものと考えられた。一方、ChWB法では、紫外線照射後のクロマチン画分において γ H2AXおよびモノユビキチン化PCNAの経時的増加を検出した。また、ENU処理後には、APE1およびPOLBについて、高塩濃度可溶化画分およびクロマチン画分で処理依存的な増加が認められた。これらの結果から、ChWB法により、DNA損傷の種類や処理後時間に応じたクロマチン上のDNA損傷応答反応を検出できる可能性が示された。以上より、固定化組織標本を用いたChIP法には感度面で課題が残る一方、ChWB法はDNA損傷応答関連タンパク質のクロマチン分画変化を検出するDDR法の基盤技術として有用である可能性が示された。

A. 研究目的

化学物質の発がん性評価において、遺伝毒性評価結果は極めて重要な情報である。特に、DNA損傷を誘発し、遺伝子突然変異や染色体異常を引き起こす化学物質は、発がん性を有する可能性があるため、リスク評価上慎重な取扱いが求められる。しかし、既存の遺伝毒性試験は、主として遺伝子突然変異、小核形成、染色体異常等の比較的

下流のエンドポイントを検出するものであり、曝露直後から生じるDNA損傷応答反応、DNA修復反応、損傷乗り越えDNA合成等の分子応答を、発がん性定量評価に資する形で解析する手法は十分に確立されていない。

また、遺伝毒性陽性と判断される化学物質であっても、発がん性試験データが存在しない、あるいは定量的発がん性評価に利用可能な情報が限られる場合がある。その

ような場合、遺伝毒性の有無だけでなく、どのようなDNA損傷応答が、どの程度、どの時間軸で誘発されるのかを明らかにすることは、発がん性の強さや作用機序を推定する上で有用な情報となる可能性がある。

本分担研究では、DNA損傷応答反応や関連する分子反応を、クロマチン上で生じる分子イベントとして定量定性的に捉える新手法、すなわちDDR法の開発を目的とした。昨年度までの先行研究では、クロマチン免疫沈降法（ChIP法）を用いて、固定化動物組織標本におけるDNA損傷応答反応を解析するための基盤的検討を行い、特にAPE1を指標としたアルキル化DNA損傷応答反応検出の可能性を示した。本年度は、その後継課題として、固定化動物組織標本へのChIP法適用性をさらに検証するとともに、培養細胞を用いたクロマチン分画ウエスタンブロット法（ChWB法）により、DNA損傷応答関連タンパク質のクロマチン画分への分画変化を解析し、DDR法としての有用性を検討した。

B. 研究方法

1. 固定化動物組織標本を用いたChIP法によるDNA損傷応答解析

ChIP法では、昨年度までの先行研究での検討により適用可能性が見出された「拡大希釈および終夜脱架橋」による固定組織可溶化条件を用いた。解析対象には、従来の*in vivo*遺伝毒性評価で実施されている*in vivo*末梢血小核試験の投与プロトコルを参照して作成したマウス組織標本を用いた。

C57BL/6NCrSlcマウス（8週齢、雄、各群3匹）に、PBS、N-ethyl-N-nitrosourea（ENU）（100、50または25 mg/kg体重/回）、ethyl methanesulfonate（EMS）（200、100または50 mg/kg体重/回）または2-acetylaminofluorene（2-AAF）（200、100または50 mg/kg体重/回）を24時間ごとに2回腹腔内投与した。最終投与24時間後に肝臓および血液を採取し、肝臓は10%中性緩衝ホルマリン液で終夜固定した後、PBSで洗浄し、凍結保存し

た。血液については*in vivo*小核試験に適用した。

固定化肝臓組織標本を可溶化し、超音波処理によりChIPに適したDNA断片を調製した後、塩基除去修復に関与するAPE1を認識する抗体を用いて免疫沈降を行った。得られたDNA画分を鋳型として、rDNA上に設定した標的領域に対する定量PCRを実施し、APE1と共沈するDNA量を%Input値として算出した。これにより、アルキル化DNA損傷等に伴うAPE1のクロマチン上への結合変化を指標として、DNA損傷応答反応の検出を試みた。

2. クロマチン分画ウエスタンブロット法（ChWB法）によるDNA損傷応答解析

ChWB法では、培養細胞を用いたパイロットスタディとして、紫外線照射またはENU処理によりDNA損傷を誘発し、DNA損傷応答関連タンパク質の細胞内分画変化を解析した。

DNA損傷誘発後の細胞を、塩濃度の異なる可溶化バッファーで段階的に可溶化し、可溶化画分を回収した。さらに、残存する不溶性画分をSDS sample bufferで可溶化し、クロマチン画分として解析に供した。得られた各画分について、 γ H2AX、モノユビキチン化PCNA、APE1およびPOLBを認識する抗体を用いたウエスタンブロット解析を実施し、DNA損傷の種類および処理後時間に応じた各タンパク質の分画変化を解析した。

（倫理面の配慮）

動物を用いた実験は、所属機関における「動物実験の適正な実施に関する規定」、わが国における「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」ならびに厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して行った。加えて、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対す

る動物愛護を配慮の上で実施した。

C. 研究結果

1. 固定化動物組織標本を用いたChIP法の検討

昨年度までの先行研究での検討により、固定化組織標本に対しては、「ホルマリン固定下の肝小核試験法」を参照した強アルカリ条件による可溶化では過剰なDNA障害が生じ、ChIP法への適用が困難である一方、「拡大希釈および終夜脱架橋」による条件では、ChIP法に適用可能なDNA断片を調製できる可能性が示されていた。本年度は、この条件を用いて、先行研究で作成したENUおよびEMS投与マウス肝臓組織標本の解析を進めた。その結果、血液を用いた*in vivo*小核試験では陽性が確認された条件であったが、固定化肝臓組織標本を用いたChIP法では、培養細胞を用いた先行研究に比べて%Input値が著しく低かった。また、各投与群と対照群との間に統計学的に有意な差は認められなかった（図1）。

これらの結果から、固定化組織標本に対してChIP法を適用する場合、組織可溶化および脱架橋過程がDNA損傷応答タンパク質とクロマチンとの結合状態に影響し、検出感度を低下させる可能性が示唆された。特に、長時間ホルマリン固定された組織標本では、可溶化に強い条件または長時間の脱架橋処理が必要となるため、DNA-タンパク質間相互作用の保持と組織可溶化効率の両立が大きな技術的課題であると考えられた。

2. ChWB法による紫外線誘発DNA損傷応答の検出

ChWB法を用いて、紫外線照射後のDNA損傷応答関連タンパク質のクロマチン画分への分画変化を解析した。その結果、紫外線照射後のクロマチン画分において、照射後の培養時間に依存した γ H2AXの増加が検出された（図2A）。 γ H2AXはDNA損傷応答、特にDNA二本鎖切断や複製ストレスに

関連する代表的なマーカーであり、本結果はChWB法によりクロマチン上で生じるDNA損傷応答を検出可能であることを示すものと考えられた。また、モノユビキチン化PCNAについても、紫外線照射後の培養時間に依存した増加が認められた（図2B）。モノユビキチン化PCNAは、損傷乗り越えDNA合成に関与する重要な分子応答であり、DNA損傷後に複製を継続する過程で突然変異誘発に関与する可能性がある。したがって、モノユビキチン化PCNAを指標とすることで、単なるDNA損傷の有無だけでなく、変異誘発につながり得る損傷応答過程を捉えられる可能性が示された。なお、モノユビキチン化PCNAはクロマチン画分のみならず、特に生理的塩濃度条件で得られる可溶化画分においても、クロマチン画分と同様の変化を示した。この結果は、モノユビキチン化PCNAの検出において、画分調製条件が重要であることを示すとともに、クロマチン結合性の強弱を含めた分画解析により、DNA損傷応答の状態をより詳細に把握できる可能性を示している。

3. ChWB法によるENU誘発DNA損傷応答の検出

ENU処理細胞を用いて、塩基除去修復に関連するAPE1およびPOLBの分画変化を解析した。150 mM NaCl条件の可溶化画分では、APE1およびPOLBの検出量にENU処理の有無による明確な変化は認められなかった。一方、生理的塩濃度条件で可溶化されずに残った不溶性画分に対して高塩濃度バッファーを処理して得られる可溶化画分では、APE1およびPOLBはいずれもENU処理後4時間で検出量の増加を示し、24時間後にもその増加が残存した。さらに、クロマチン画分においても同様の増加傾向が認められた（図3）。

これらの結果から、ENUによって誘発されるアルキル化DNA損傷に対して、塩基除去修復に関与するAPE1およびPOLBがクロマチン近傍またはクロマチン画分へ動員さ

れることを、ChWB法により検出できる可能性が示された。特に、ChIP法では固定化組織標本における感度低下が課題となった一方、ChWB法では培養細胞におけるDNA損傷応答関連タンパク質の分画変化を比較的明瞭に検出できたことから、DDR法の基盤技術として有用であると考えられた。

D. 考察

本分担研究では、DNA損傷応答反応や関連する分子反応を、クロマチン上またはクロマチン近傍で生じる分子応答として定量的に検出するDDR法の開発を目的として、ChIP法およびChWB法の検討を行った。

ChIP法については、昨年度までに固定化組織標本への適用可能性を見出していたものの、本年度の追加解析では、培養細胞を用いたChIP法と比較して%Input値が著しく低く、投与群間の有意差を明確に検出するには至らなかった。この原因として、組織標本のホルマリン固定条件が、一般的なChIP法で用いられるホルムアルデヒド架橋条件と比較して強く、また固定時間も長いことが挙げられる。固定化組織標本を可溶化するためには終夜脱架橋等の処理が必要となるが、この過程でDNA損傷応答解析の標的であるAPE1等のタンパク質がクロマチン画分から遊離し、免疫沈降により回収されるDNA-タンパク質複合体が減少した可能性がある。この点から、発がん性試験や毒性試験で得られる既存の固定化組織標本にChIP法を適用するには、可溶化効率、DNA断片化、抗原性保持、DNA-タンパク質間相互作用の保持を同時に満たす条件設定が必要であり、技術的難度は高いと考えられる。一方で、固定化組織標本を用いてDNA損傷応答を解析できれば、既存の発がん性試験材料と遺伝毒性応答解析を直接結びつけることが可能となる。そのため、ChIP法については、現時点で実用化には課題が残るものの、発がん性試験材料を活用した遺伝毒性・発がん性相関解析のための技術として、引き続き検討する意義がある。

一方、ChWB法では、紫外線処理により誘発されるDNA損傷応答関連タンパク質の分画変化を比較的明瞭に検出することができた。紫外線照射後には γ H2AXおよびモノユビキチン化PCNAのクロマチン画分における経時的増加が認められ、ENU処理後にはAPE1およびPOLBの高塩濃度可溶化画分ならびにクロマチン画分における増加が認められた。これらの結果は、ChWB法が、DNA損傷の種類に応じたDDR関連タンパク質のクロマチン動員またはクロマチン保持状態を捉える手法として有用であることを示している。特に、モノユビキチン化PCNAは損傷乗り越えDNA合成に関与する重要な分子反応であり、DNA損傷が単に存在することを示すだけでなく、その後の変異誘発過程に関与し得る応答を反映する可能性がある。したがって、ChWB法によるモノユビキチン化PCNAの検出は、発がん性定量評価に資するDDR指標の一つとして有望であると考えられる。また、APE1およびPOLBの分画変化は、アルキル化DNA損傷に対する塩基除去修復反応を反映する可能性があり、化学物質の作用機序に応じたDDRプロファイルの構築につながると期待される。

さらに、班内で松田により進められているクロマチン定量プロテオミクス法は、現時点では本分担研究者の直接の担当課題ではないものの、将来的にはChWB法と相補的に活用できる可能性がある。ChWB法は、特定のDDR関連タンパク質について、比較的簡便に分画変化を確認できる利点を有する。一方、クロマチン定量プロテオミクス法は、多数のDNA損傷応答・修復関連タンパク質を定量的に解析できる可能性がある。したがって、今後、ChWB法により候補となるDDRマーカーを絞り込み、クロマチン定量プロテオミクス法によりより広範な分子応答プロファイルを取得する、あるいは逆にプロテオミクス解析で得られた候補分子をChWB法で検証するような連携が可能となれば、DDR法全体の有用性を高めるこ

とができると考えられる。

以上より、本年度の検討から、固定化組織標本を用いたChIP法には技術的課題が残る一方、ChWB法は培養細胞におけるDNA損傷応答関連タンパク質のクロマチン分画変化を検出する手法として有用である可能性が示された。今後は、複数の遺伝毒性物質および非遺伝毒性物質を用いた比較解析、用量反応性および時間反応性の検討、ならびに既存の遺伝毒性エンドポイントとの対応関係の解析を進めることで、DDR法を発がん性定量予測に資する新規ゲノム安全性評価手法として発展させることが重要である。

E. 結論

本分担研究では、DNA損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法、すなわちDDR法の開発を目的として、ChIP法およびChWB法の検討を行った。

固定化動物組織標本を用いたChIP法では、昨年度見出した「拡大希釈および終夜脱架橋」による可溶化条件を用いて解析を進めたが、培養細胞を用いたChIP法と比較して%Input値が著しく低く、投与群間の統計学的有意差を明確に検出するには至らなかった。この結果から、長時間ホルマリン固定された組織標本にChIP法を適用するには、DNA-タンパク質間相互作用の保持と組織可溶化を両立する条件のさらなる最適化が必要であると考えられた。一方、ChWB法では、紫外線照射後の γ H2AXおよびモノユビキチン化PCNAのクロマチン画分での増加、ならびにENU処理後のAPE1およびPOLBの高塩濃度可溶化画分およびクロマチン画分での増加を検出した。これらの結果は、ChWB法により、DNA損傷の種類や処理後時間に応じたクロマチン上のDNA損傷応答反応を検出できる可能性を示している。

以上より、ChWB法は、DDR法の基盤技術として有用であり、遺伝毒性物質により誘発されるDNA損傷応答や関連する分子反

応を定量定性的に捉える新規評価手法として発展し得ると考えられた。今後は、用量反応性および時間反応性の検討、異なる作用機序を有する化学物質間でのDDRプロファイル比較、ならびに他のクロマチン解析技術との連携により、発がん性定量予測に資するDDR指標の確立を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Matsumoto M, Natsume M, Iso T, Umamo T, Murata Y, Masumura K, Horibata K, Sugiyama KI. Increased mutagenicity in the liver of MutaMouse females following oral treatment with commercial-grade toluene diisocyanate. *Genes Environ.* 2025;47:12.

G.2. 学会発表

1. 増村健一, 安東朋子, 堀端克良, 石井雄二, 杉山圭一：マウスを用いたアクリルアミドの *in vivo* 変異原性と次世代に誘発される生殖細胞系列突然変異の解析. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7)
2. 吉田愛海, 江田侑未, 杉山圭一, 堀端克良：遺伝情報発現に付随する突然変異誘発と細胞周期の影響. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
3. 江田侑未, 佐々木沙耶, 吉田愛海, 杉山圭一, 堀端克良：クロマチン画分上の DNA 損傷応答解析を利用した遺伝毒性反応の検出. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
4. 松本真理子, 磯貴子, 馬野高昭, 大道友香, 広瀬望, 若山美智子, 増村健一, 堀端克良, 杉山圭一：グリシジルメタクリ

別添 4

レート経口投与による雄 MutaMouse
における in vivo 変異原性の検討. 日本
環境変異原ゲノム学会第 54 回大会
(2025.11)

5. 羽倉昌志, 須井哉, 川上久美子, 加藤雅之, 皿田巳子, 杉山圭一, 堀端克良, 峯川和之, 山本美佳, 山田雅巳 : TA100 株の感受性の違いについての一考察 (BMS pilot study). 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
6. グルーズピーター, 山田雅巳, 堀端克良, 杉山圭一 : AlkB と触媒活性を欠損した DNA ポリメラーゼ IV が Ames 試験で hisG46 標的の変異誘発に及ぼす影響. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

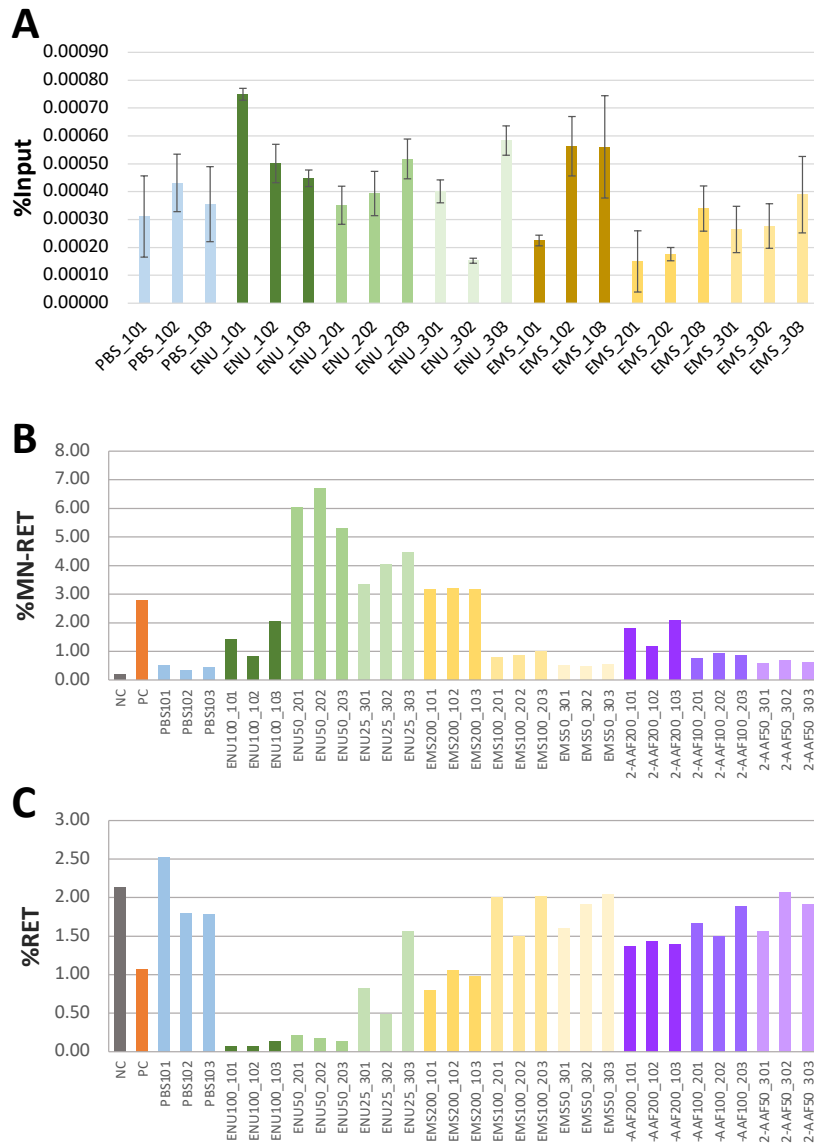


図 1. ホルマリン固定肝臓組織標本を用いた APE1 ChIP 解析および in vivo 小核試験
 ENU、EMS または 2-AAF を投与したマウスから採取したホルマリン固定肝臓組織標本を用い、抗 APE1 抗体による ChIP 解析を実施した。ChIP 解析では、rDNA 上の標的領域における APE1 結合量を %Input として算出し、未処理群および各投与群間で比較した (A)。同一投与条件における末梢血を用いた in vivo 小核試験の結果を B に、骨髓抑制の評価結果を C に示す。小核試験では遺伝毒性陽性が確認された条件を含む一方、ホルマリン固定肝臓組織標本を用いた ChIP 解析では、APE1 のクロマチン結合量に明確な投与依存的増加は認められなかった。

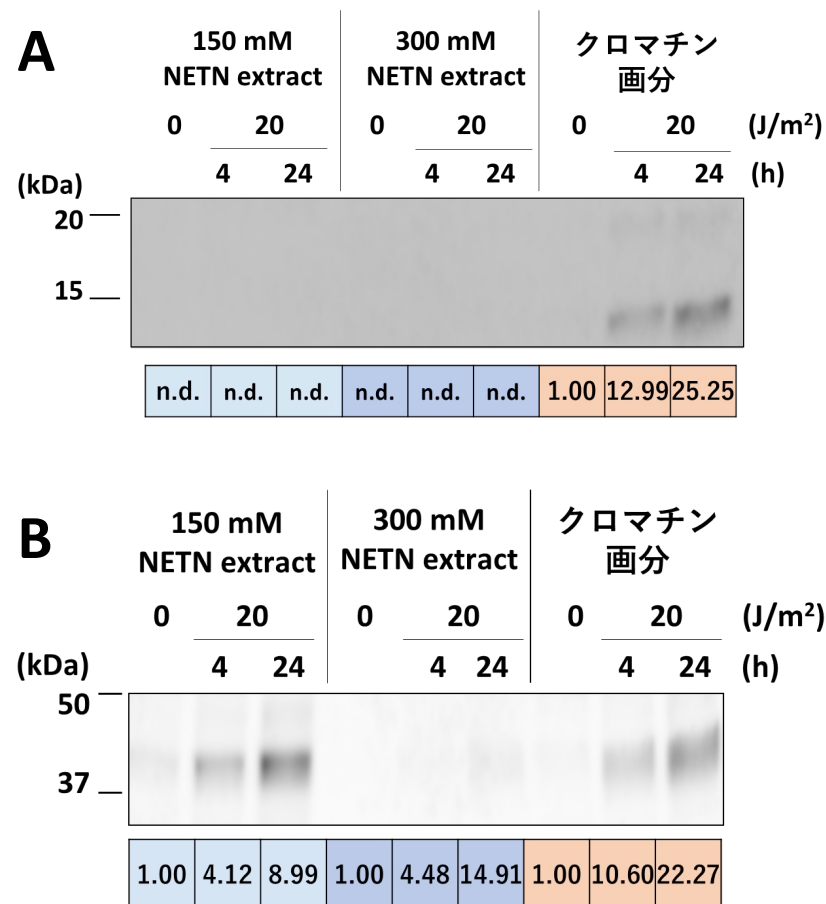


図 2. UV-C 照射後に誘導される DNA 損傷応答タンパク質の細胞内分画変化
UV-C 照射後の細胞を、150 mM NETN buffer 可溶化画分、300 mM NETN buffer 可溶化画分、およびクロマチン画分に分画し、 γ H2AX (A) およびモノユビキチン化 PCNA (Ub-PCNA) (B) の分布をウエスタンブロットにより解析した。各図下の表には、ImageJ により定量したバンド強度について、未処理サンプルを 1 とした相対値を示す。UV-C 照射後、クロマチン画分において γ H2AX および Ub-PCNA の経時的な増加が認められ、ChWB 法により紫外線誘発 DNA 損傷に伴うクロマチン上の DNA 損傷応答を検出できることが示された。n.d.; not detected.

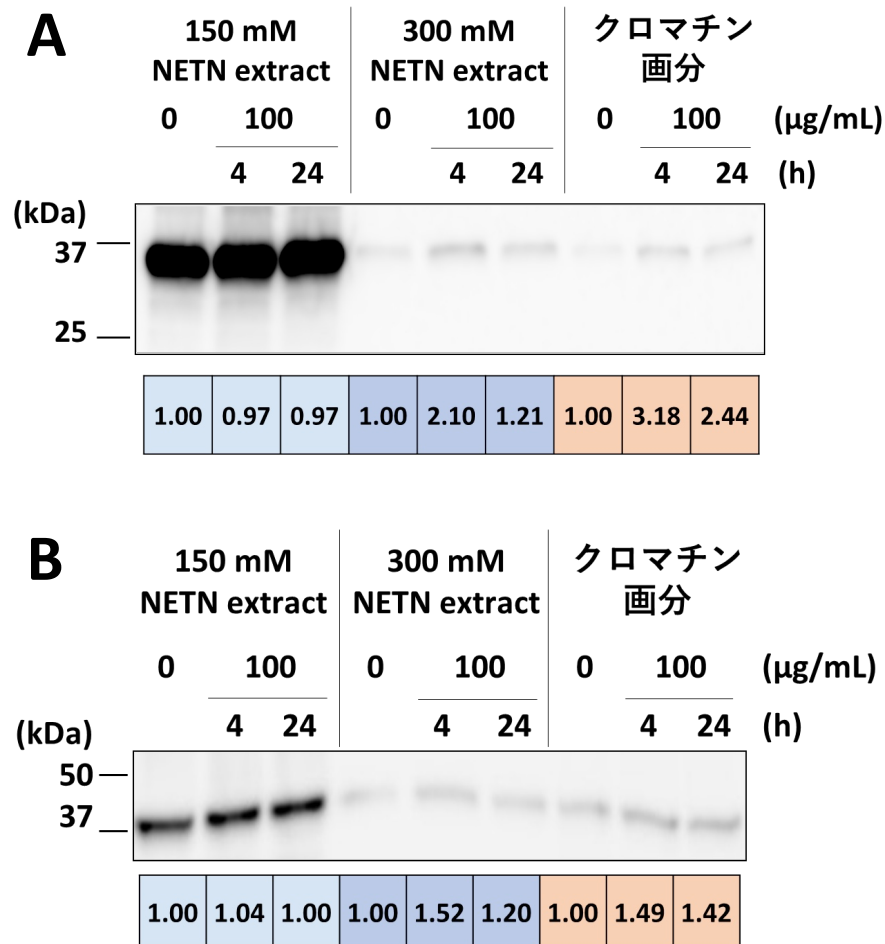


図 3. ENU 処理後に誘導される塩基除去修復関連タンパク質の細胞内分画変化

ENU 処理後の細胞を、150 mM NETN buffer 可溶化画分、300 mM NETN buffer 可溶化画分、およびクロマチン画分に分画し、塩基除去修復に関与する APE1 (A) および POLB (B) の分布をウエスタンブロットにより解析した。各図下の表には、ImageJ により定量したバンド強度について、未処理サンプルを 1 とした相対値を示す。ENU 処理後、APE1 および POLB は 300 mM NETN buffer 可溶化画分およびクロマチン画分で増加傾向を示し、アルキル化 DNA 損傷に応答した修復関連タンパク質のクロマチン近傍またはクロマチン画分への動員を ChWB 法により検出できる可能性が示された。n.d.; not detected.

令和7年度 厚生労働科学研究費 補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
分担研究課題名: DNA損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法
(DDR法) の開発

研究分担者：松田 俊
所属 京都大学大学院工学研究科

研究要旨

本分担研究では、発がん性定量的評価に資する情報がない化学物質の評価を迅速かつ効率的に進めるため、発がん性定量評価の新しい指標としてDNA損傷応答に着目した評価手法を開発することを目的とする。

発がん主要因のDNA損傷に応じて各種DNA損傷応答・修復タンパク質が損傷部位のクロマチンに集積する分子メカニズムに着目して、質量分析装置のターゲット測定によるクロマチン定量プロテオミクス法の開発に着手した。まず既報（松田ら, *Genes Environ.* 45:37 2023）をもとに、夾雑物や副反応（タンパク質のN末端や側鎖のアミノ基のカルバミル化）を低減したクロマチン分画、タンパク質消化方法を改良した。ヒトリンパ芽球由来TK6(IVGT)細胞を、臨床で起こり得る濃度（0.115 μM ）の遺伝毒性発がん物質エトポシドに曝露した結果、5種DNA損傷応答・修復タンパク質（ γH2AX 、RAD50、MDC1、53BP1、及びXRCC6）のクロマチン画分中の存在量が3.9倍以上増加することを確認した。本手法は化学物質による発がん関連応答を捉える評価系として有用であることを示した。

A. 研究目的

化学物質の定量的発がん性評価は、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）等の化学物質安全対策行政上の種々のリスク評価において必要であり、遺伝毒性の定性的評価結果と発がん性試験結果に基づき有害性評価値を導出する。しかし、遺伝毒性陽性と判断され発がん性の懸念があるにもかかわらず、発がん性定量的評価に資する情報がない化学物質については、発がん性定量的評価を行うことができない。これらの評価を迅速かつ効率的に進めるために、多大な労力等を要する発がん試験に代わる、新たな発がん性定量的評価手法の開発と確立が求められている。本研究班では、発がん性定量評価を可能とするような新しい指標をゲノム安全性の観点

から見出し、それらを活用した評価手法を開発するとともに、新手法と既存の発がん性試験結果等との定量定性的な相関性を明らかにすることで定量的化学物質発がん性予測への適用性を検証するとともに、OEC Dテストガイドライン等へ反映させることを目指す。

本分担研究では、発がん性定量評価の新しい指標としてDNA損傷応答に着目した評価手法の開発を目的とする。具体的には、発がん主要因のDNA損傷に応じて各種DNA損傷応答・修復タンパク質が損傷部位のクロマチンに集積する分子メカニズムに着目して、質量分析装置のターゲット測定によるクロマチン定量プロテオミクス法を開発する。これにより、ゲノム毒性発現初期反応であるDNA損傷応答や関連する分子

反応等を定量定性的に捉える。

最終的には研究班全体として新手法の適用性検証を踏まえ、既存の発がん性試験等の入手可能な検体等への幅広い適用検証を試み、既存の方法と新手法との定量定性的な相関関係を明らかにするとともに、国際ガイドライン等への適用を進める。

B. 研究方法

ヒトリンパ芽球由来TK6(IVGT)細胞を所定濃度および時間のエトポシド (ETP) に曝露した後、液体窒素による凍結融解で細胞の膜を破壊した。細胞ペレットを等張液で洗浄し、遊離 (クロマチンに結合していない) タンパク質を抽出除去した。ペレットを高張液で洗浄することで、クロマチンに弱く結合するタンパク質を抽出した (画分①)。残ったペレットに2 M NaClを添加して超音波破碎処理でクロマチンを破壊後、遠心分離で上清を回収した (画分②)。各画分のタンパク質をトリクロロ酢酸沈殿法で回収した。タンパク質をデオキシコール酸ナトリウム (SDC) を含む緩衝液で再溶解し、内部標準として測定対象のペプチドに対応する安定同位体を添加した。これをジチオスレイトール及びヨードアセトアミドで還元アルキル化し、トリプシン消化を行った。固相抽出で消化物 (ペプチド) を脱塩精製して5%アセトニトリルに再溶解し、高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) で、測定対象タンパク質に特異的なペプチドを定量した。LC-MS/MSにはWaters社Xevo TQ-Sを使用し、Multiple reaction monitoringモードで測定した。

C. 研究結果

使用する培養細胞としてTK6(IVGT)細胞を、遺伝毒性発がん物質としてトポイソメラーゼII阻害剤ETPを選択した。まず用量設定のために細胞毒性試験を行い、24 h曝露で生細胞密度が陰性対照の半分となる濃度 (IC50: 0.115 μM) を求めた。次に、

TK6(IVGT)細胞をIC50のETPに曝露した後、5種類のDNA損傷応答及び修復タンパク質のクロマチン画分中存在量の経時変化を最長24 hまで測定した。DNA損傷のバイオマーカーとして知られる γH2AX (H2AXのS139リン酸化体) は、曝露6 h以降にクロマチン画分中から検出され、24 hまで経時的に増加した (図1(a))。DNA損傷応答タンパク質について、MDC1のクロマチン画分中の総量は曝露1 hから増加してほぼプラトーに達し (0 h比で最大4.6倍)、53BP1は曝露1 hから増加し、曝露24 hで最大 (同54.9倍) となった (図1(b)及び(c))。DNA二本鎖切断修復を担うRAD50及びXRCC6のクロマチン画分中の総量は曝露1 hから増加し、RAD50は曝露6 hで最大 (同3.9倍) となり、XRCC6は曝露24 hまで経時的に増加した (同157.1倍) (図1(d)及び(e))。一方、非リン酸化H2AXのクロマチン画分中の総量に2倍以上の変動は見られなかった (図1(f))。

D. 考察

既報 (松田ら, *Genes Environ.* 45:37 2023) の前処理法を改変した。具体的にはトリプシン消化に用いるタンパク質変性剤を尿素からSDCに変更し、尿素に起因する副反応 (タンパク質のN末端や側鎖のアミノ基のカルバミル化) を抑制した。さらに、ゲノムDNA断片化をDNase I添加による消化から超音波破碎に変更し、夾雑成分を低減した。本研究ではETP曝露により、TK6(IVGT)細胞中の γH2AX 含め各種DNA損傷応答・修復タンパク質のクロマチン結合量が増加した一方、これらの変動はタンパク質によって異なることを明らかにした。ETPの血漿タンパク質結合率 (94%) に基づけば、標準用量 (100 mg/m²) の投与患者の遊離体血中最大濃度は約1-2 μM であり、血中終末半減期6-18 hを考慮する (IARC Monographs Vol.76) と、本研究で採用した濃度 (0.115 μM) はヒトで実際に到達する条件であると考えられる。現在さらなる

低用量域における、ETPとクロマチン画分中各種DNA損傷応答及び修復タンパク質の用量応答を測定中である。さらに他のDNA損傷応答・修復タンパク質や、細胞周期制御やヒストン修飾など、測定対象の拡大も進めており、これにより多様なメカニズムを有する遺伝毒性発がん物質の発がん性評価に貢献できる可能性がある。

E. 結論

前処理法を改良し、処理中の副反応（タンパク質のN末端や側鎖のアミノ基のカルバミル化）の抑制、試料に添加する夾雑物の低減を行った。確立した手法の概念実証のために、TK6(IVGT)細胞と遺伝毒性発がん物質ETPを用いた曝露実験を実施した。ETP曝露によりクロマチン画分中のDNA損傷応答・修復タンパク質（ γ H2AX、MDC1、53BP1、RAD50、XRCC6）が増加したことを確認し、これらタンパク質のクロマチン結合量の増加が発がん性評価の指標となり得ることを示した。IARC資料に基づくETPの臨床用量における遊離体の血漿中最大濃度（1–2 μ M）及び血中終末半減期（6–18 h）を考慮すると、本研究で採用した曝露濃度（0.115 μ M）は、臨床用量で実際に到達し得るETP濃度域に相当し、この実際的な濃度条件下で生じるクロマチン結合タンパク質の変動を捉えた点において、生物学的に妥当な発がん関連応答の評価系であることを示している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. T Hotani, M Goto, Y Otsuki, **S Matsuda**, N Wada, M Shinohara, T Matsuda, M Yokoi, K Sugawara, Y Ohsaki, W Sakai. Dynamics of Fanconi anemia protein D2 in association with nuclear lipid droplet formation. *J Cell Sci.* 138(21):jcs264430, 2025

G.2 学会発表

1. M Han, T Matsuda, **S Matsuda**, Biotransformation of orexin receptor antagonists in activated sludge, 9th International Symposium of the Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society (Kyoto) (2025.12)
2. S Oka, T Matsuda, **S Matsuda**, Proposal of a quantitative chromatin proteomics-based method for assessing chemical carcinogenicity, 9th International Symposium of the Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society (Kyoto) (2025.12)
3. **S Matsuda**, Visualization and absolute quantification of the DNA damage responses for chemical genotoxicity assessment, The National Cheng Kung University–Kyoto University Research Exchange Forum: Sustainability and Disaster Prevention (Tainan, Taiwan) (2025.12)
4. 岡辰太郎、松田知成、**松田俊**、クロマチン定量プロテオミクス法による化学物質発がん性判別法の提案、日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（静岡）（2025.11）
5. 溝口夏生、松田知成、**松田俊**、遺伝子治療用ウイルスベクターの環境リスク評価—メダカ胚細胞を用いたベクターの感染能評価—、日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（静岡）（2025.11）
6. 吉野純、松田知成、**松田俊**、遺伝子治療に用いられるアデノ随伴ウイルスベクターのメダカに対する感染リスクの in vitro 評価、日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（静岡）（2025.11）
7. 吉野純、松田知成、**松田俊**、遺伝子治療に用いられるアデノ随伴ウイルスベクターのメダカに対する感染リスクの in vitro 評価、京都大学環境衛生工学研究会第 47 回シンポジウム（京都）（2025.7）

別添 4

8. 岡辰太郎、松田知成、松田俊、石川良賀、岡めぐみ、ディーゼル排気微粒子が誘導する突然変異パターンと DNA 付加体の解析、京都大学環境衛生工学研究会第 47 回シンポジウム（京都）
(2025.7)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

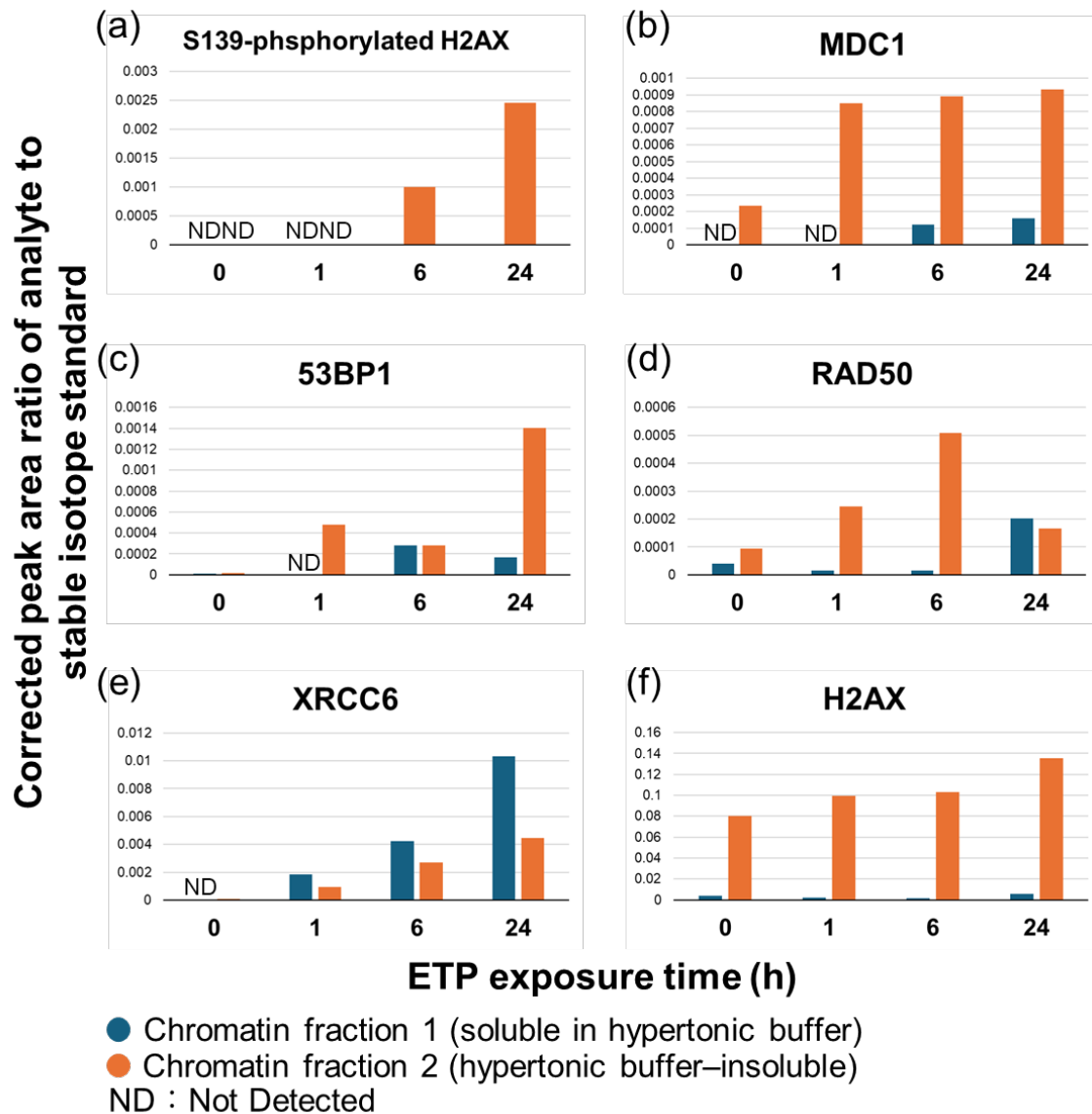


図 1. ETP 曝露後の DNA 損傷応答・修復タンパク質のクロマチン画分中存在量の変化
TK6 (IVGT) 細胞を 0.115 μ M ETP に各時間曝露した後、クロマチン結合タンパク質を分画抽出した。画分中の (a) S139 リン酸化 H2AX (γ H2AX)、(b) MDC1、(c) 53BP1、(d) RAD50、(e) XRCC6、(f) H2AX (非リン酸化体) を LC-MS/MS で定量した。

令和7年度 厚生労働科学研究費 補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
分担研究課題名: 第Ⅱ相薬物代謝も勘案した*in vitro*小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究

研究分担者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部 室長

研究要旨

発がん性定量評価を可能とするような新しい指標をゲノム安全性の観点から見出し、それらを活用した評価手法を開発するとともに、新手法と既存の発がん性試験結果等との定量定性的な相関性を明らかにすることを目標とする。遺伝毒性物質の活性化や解毒に関して、第Ⅱ相薬物代謝酵素が重要な役割を担うにも関わらず、これまでの*in vitro*遺伝毒性試験ではその代謝酵素の機能がほとんど勘案されていない。本研究では、ラット肝S9の第Ⅰ相代謝酵素だけでなく、第Ⅱ相代謝酵素（硫酸転移酵素（SULT））を機能させるため、その補因子 3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸（PAPS）を補充した*in vitro*小核試験系を構築することからはじめ、代謝酵素機能の有無で変化するDNA損傷応答（小核形成能）を同定・定量し、*in vitro*と*in vivo*ギャップの原因を明らかにすることで発がん性定量評価の予測向上に寄与する。SULTの抱合作用によって遺伝毒性活性化することが知られているアリストロキア酸Iに対して、PAPS補充した*in vitro*小核試験を実施した結果、既知通りPAPS補充群は、非補充群よりも小核細胞数（DNA損傷性）を増強させることが分かった。PAPS補充する*in vitro*小核試験系をほぼ構築できたと考えられるが、2倍程度の小核細胞数を誘発させられる陽性対照物質は見出されておらず、より多くの小核細胞数を誘発させる強い遺伝毒性化学物質を引き続き探索する予定である。

A. 研究目的

薬物代謝の第Ⅰ相、および第Ⅱ相代謝酵素は、遺伝毒性物質の活性化や解毒に重要な役割を担う。しかし、*in vitro*遺伝毒性試験では第Ⅱ相代謝酵素の機能がほとんど勘案されておらず、*in vitro*と*in vivo*試験結果のギャップを生じさせる要因の一つと考えられる。本研究では、ラット肝S9の第Ⅰ相および第Ⅱ相代謝酵素を機能させるため、それらの補因子を補充した*in vitro*小核試験系を構築し、代謝酵素機能の有無で変化するDNA損傷応答（*in vitro*小核試験）を同定・定量し、先のギャップの原因を明らかにすることで発がん性定量評価の予測向上

に寄与する。

令和7年度は、第Ⅱ相薬物代謝酵素の硫酸転移酵素（SULT）を機能させる補因子PAPSを補充した*in vitro*小核試験系を構築するために、PAPS補充、あるいはPAPS合成系（PAPS-Generating System; PGS）を用いて小核細胞の誘発が2倍程度に増加する陽性対照物質を探索した。その候補物質として、アリストロキア酸I（AA-I）を用いた。AA-Iの発がん性情報について、AA-Iを含む製剤を服用した患者で腎障害（AAN）と上部尿路上皮癌が高頻度に見られたこと、さらにバルカン腎症関連の尿路上皮癌でもアリストロキア酸由来DNA付加体と特徴的変

異が検出され、原因物質としての因果性が強く支持されたことがある (Nortier JL et al., N Engl J Med. 342, 1686-92 (2000)、Grollman AP et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 12129-34 (2007))。アリストロキア酸のばく露と上部尿路上皮癌の関連が示され、IARCはアリストロキア酸をヒトに対する発がん性あり (Group 1) と評価している (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100A)。AA-Iの発がん性は、少なくともSULTが関与していると考えられ、AA-IのDNA付加体を増加させることがよく知られている (Sidorenko et al. Carcinogenesis 35, 1814 - 22 (2014)、Hashimoto et al. Carcinogenesis 37, 647 - 55 (2016)、Arlt et al. Arch Toxicol. 91, 1957-75 (2017))。

B. 研究方法

1. 細胞と培養

ヒトリンパ芽球細胞TK6株は、10% 馬血清 (サーモフィッシャー)、200 μ g/mLピルビン酸ナトリウム (和光純薬工業株)、100 U/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシン (ナカライテスク株) を含むRPMI培地 (ナカライテスク株) で培養された。培養は、37度、5% CO₂濃度存在下で行った。

2. *in vitro*小核試験

原則としてOECDガイドラインTG487に従って実施した。被験物質の処理時間は3時間、回復時間は約22時間として小核標本作製した。ラット肝S9とコファクターは、家田貿易株式会社から購入した。PAPS試薬は、富士フイルム和光純薬工業から購入した。PGS系は、主にWatabeらの論文を参考にして、実験条件を決めた (Watabe T. et al., Science 215, 403-5 (1982)、Mori M. et al., J Pharmacobiodyn 9, 1036 - 9 (1986)、Weththasinghe SA. et al., Drug Test Anal. 10, 330-9 (2018))。PGSで使用されるATPとNa₂SO₄は、富士フイルム和光純薬、MgCl₂

はNIPPON GENEから購入した。AA-Iはシグマアルドリッチから購入した。陽性対照物質は、シクロホスファミド (CP) (東京化成工業株式会社) を使用した。細胞毒性指標は、処理してから24時間後の相対的細胞集団倍加数 (Relative Population Doubling: RPD) を採用し、その値が50%程度となる用量を最大用量として本試験を実施した。小核細胞の分析は、40 μ g/mLアクリジンオレンジ (Sigma-Aldrich) を使用し、B励起による蛍光顕微鏡 (400倍) で観察した。各用量1000細胞あたりの小核細胞をカウントし、これを2回繰り返すことによって、被験物質1回の処理に対して合計2000細胞 (1000 x 2細胞) を観察した。統計分析のために、被験物質を少なくとも2回処理し、合計3000から4000細胞あたりの小核細胞数を調べた。処理群における有意差検定では、2～3回の小核試験 (計3000～6000細胞あたりの小核保有細胞を計測) を実施し、t検定 (有意水準5%) を行った。

(倫理面の配慮)

*In vitro*小核試験は培養細胞株を用いるため、個人情報保護および生命倫理に関する規定には抵触しない。

C. 研究結果、および考察

1. AA-Iの用量設定試験

*In vitro*小核試験の用量設定試験は、AA-IをDMSOに溶解させ、2 mg/mLを最高用量として公比3で実験を行った。最終濃度222 μ g/mL以上で析出が観察された。RPD値が40～50%となる至適用量が74.1～222 μ g/mLの間にあることが分かった (Fig. 1)。また、300 μ M PAPSを補充する予備実験において、非補充群よりも補充群の細胞毒性が非常に増強されることが判明したため、RPD値が50%付近となる用量を至適用量として定義することにした。よって、AA-Iの至適用量は74.1 μ g/mLとして実験をすすめた (Fig. 1)。

2. PAPS補充量、およびPGS補充量に対する細胞毒性と小核細胞数の変化

74.1 $\mu\text{g/mL}$ AA-IのRPD値が約50%であることを起点として、PAPS補充（0、150、300、600 μM ）、あるいはPGS補充（0、2、4、8 mM（ATP濃度））したときの細胞毒性（RPD）と小核細胞数を計測した（Fig. 2 AおよびD）。PAPS試薬は比較的高価であるため、研究予算の都合から600 μM を最大とした。RPD値は、PAPSおよびPGSともに、補充量が増加しても約50 %付近で推移した。一方、小核細胞数については、PGS補充量を増やすと24個から36個（1000細胞あたり）へ増加したが、PAPS補充群は、補充量から600 μM に増加させたとき、わずか19個から23個（1000細胞あたり）だった。その4個の増加は、PGS補充群2 mM以下の効率（6個の増加に相当）であり、300~600 μM PAPS補充量程度ではAA-Iの小核形成を検出することが難しいことが分かった（Fig. 2 AおよびD）。また、PAPS自体の安定性は高くないため反応するまでに一部が分解している可能性も考えられる。

3. PAPS補充、およびPGS補充によるAA-Iの細胞毒性の比較

300 μM PAPS補充（研究費予算の都合から300 μM を採用）、および8 mM PGS補充の実験条件において、各補充の有無におけるAA-I用量に対する細胞毒性を測定した（Fig. 2BおよびE）。その結果、74.1 $\mu\text{g/mL}$ AA-I用量のとき、PAPS補充群は55.2%、PAPS非補充群は58.4%であった。つまり、PAPS補充群および非補充群の各RPD値には、有意な差が無かった。一方、74.1 $\mu\text{g/mL}$ AA-I用量のとき、PGS補充群は42.8 %、PGS非補充群は63.8 %であった。PGS群のRPD値は明らかに非補充群のそれよりも増強しており、統計的にも有意差が得られた（Fig. 2 E）。

4. PAPS補充、およびPGS補充によるAA-Iの小核細胞数の比較

300 μM PAPS補充、および8 mM PGS補充の条件において、それぞれ補充の有無におけるAA-I用量に対する小核細胞数を測定した（Fig. 2CおよびF）。その結果、74.1 $\mu\text{g/mL}$ AA-I用量のとき、PAPS補充群は79個、PAPS非補充群は63個（4000細胞あたり）であった。その1用量だけで統計的有意差が認められたが、その他の用量群では有意差は無かった（Fig. 2C）。一方、PGS実験では、74.1 $\mu\text{g/mL}$ AA-I用量のとき、PGS補充群は86個、PGS非補充群は55個（3000細胞あたり）であった。PGS補充群の小核細胞数は明らかに非補充群のそれよりも増強しており、74.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の複数の用量群で統計的有意差が得られた（Fig. 2F）。陽性対照物質としてCPを用いたが、小核試験においてS9機能がワークしたかを確認するためであり、CPはPAPS補充によって小核細胞数を増やすことはない。つまり、PGSを利用した本研究で小核細胞数の増加が認められたAA-Iが、PAPS補充型*in vitro*小核試験の陽性対照物質として有力な候補であると言える。しかしながら、非補充群の小核細胞数と比較すると30~40%程度しか増加しないため、2倍程度等より多くの小核細胞を形成させる強力な遺伝毒性物質を探索する必要がある。

以上のことから、PAPS試薬では不十分だが、PGSを用いることにより、ラットS9中に含まれるSULTの機能を十分に利用した*in vitro*小核試験を実施できることが分かった。

*In vitro*試験の最大のメリットは、早く安価に化学的な作用機序を明確化できることである。本研究においては、*in vitro*でPAPS合成を行えるPGS補充による小核試験において、もし、PGS補充で陽性、PGS非補充で陰性となった場合、PGSの有無だけで陽性陰性に違いが示されるため、その被験物質は、SULTのPAPS抱合化によって、遺伝毒性が活性化（陽性）したことを証明できる。単に*in vitro*試験で陽性になっただけでなく、代謝酵素機能の有無で変化するDNA損傷応

別添 4

答の原因が明らかになることで発がん性の定量性の予測向上、およびその作用機序も理解することができる。

AA-Iの発がんには、少なくともSULTの関与が明らかとされている (Sidorenko et al. Carcinogenesis.35, 1814-22 (2014); Hashimoto et al. Carcinogenesis 37, 647-55 (2016); Arlt et al. Arch Toxicol. 91, 1957-75 (2017))。今回、PGS補充した*in vitro*小核試験でも遺伝毒性が活性化されたことが確認 (Fig. 2F) でき、既報と一致したため、現段階において、本実験系は有用であると考えられた。

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

D. 結論

ラット肝S9存在下の条件で、SULTの補因子PAPSを合成する系を*in vitro*小核試験に補完することによって、PGS補充型の*in vitro*小核試験系をほぼ構築できたと考えられた。一方、そのための陽性対照物質が必要であるが、非補充群に対して、補充群が約2倍程度の小核細胞数を誘発させられる陽性対照物質を見つけることができていない。より多くの小核細胞数を誘発させる強い遺伝毒性化学物質を引き続き探索したいと考えている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

G.1. 論文発表

なし

G.2 学会発表

1. 安井学、鵜飼明子、本間正充、杉山圭一；Ames 試験で強い陽性を示す香料物質 6-メトキシキノリンのグルタチオン補充型 TK6 試験によるフォローアップ. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会、静岡市 (2025.11.23)

H. 知的財産権の出願・登録状況

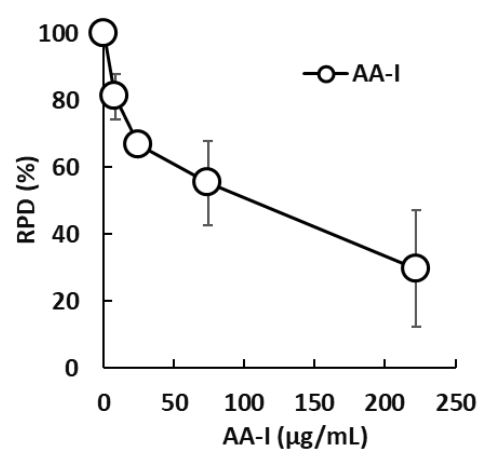


Fig. 1 RPDを用いたAA-Iの用量設定試験

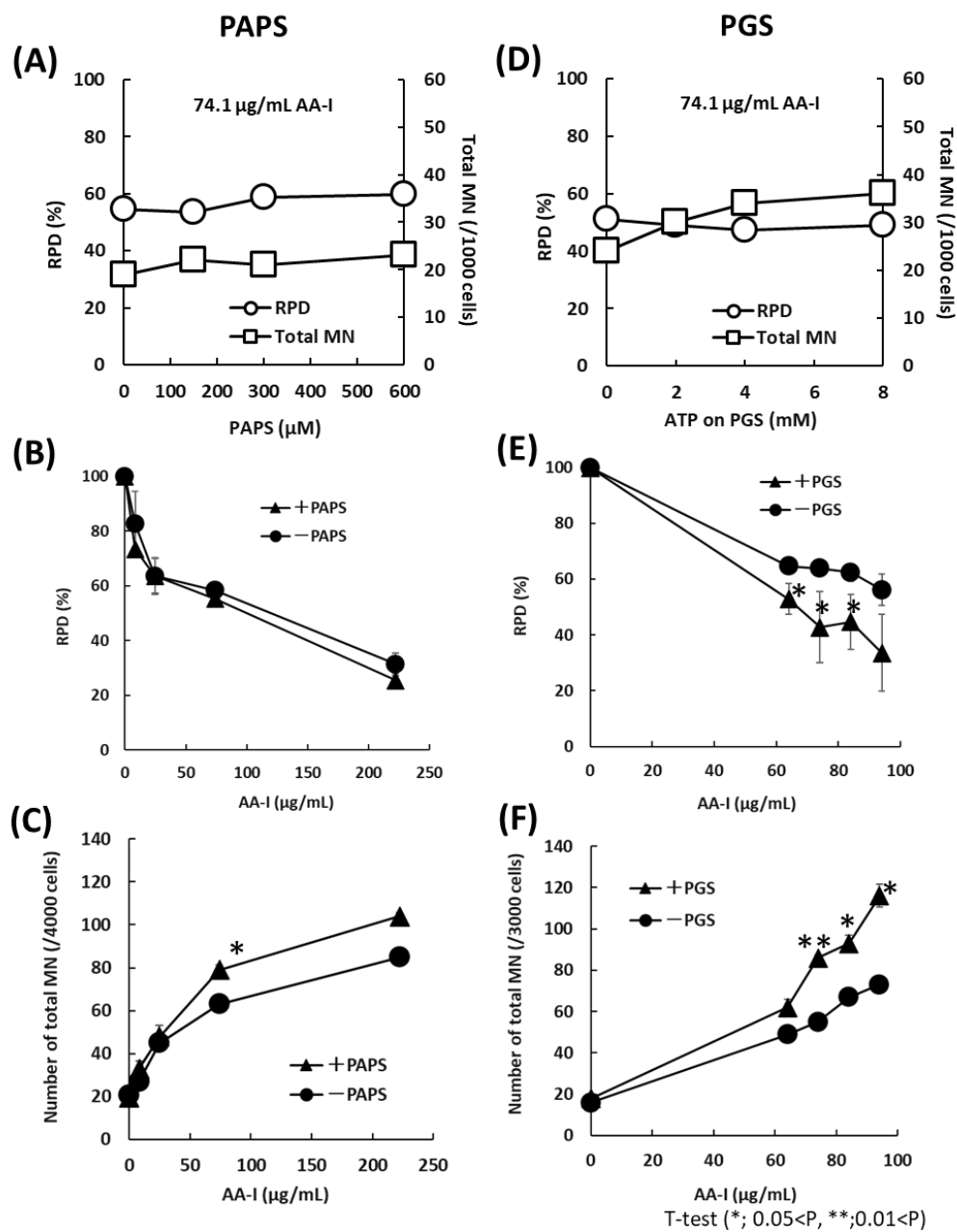


Fig. 2 PAPSおよびPGS補充によるAA-Iの小核形成能の比較

令和7年度 厚生労働科学研究費 補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
分担研究課題名: 染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の検討

研究分担者：石井雄二

所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

近年、小核はchromothripsisを介した発がんとの関連が示唆されており、染色体不安定性の指標として注目されている。本研究では、病理組織学的手法による小核検出法（HMN assay）の肝発がん性評価法としての有用性を検討するとともに、新規小核マーカーの探索を行った。雄性F344ラットに遺伝毒性肝発がん物質である2,4-dinitrotoluene（2,4-DNT）及び*p*-dimethylaminoazobenzene（DAB）、ならびに非遺伝毒性肝発がん物質であるclofibrate（CFB）を28日間反復経口投与し、肝臓小核試験及びHMN assayを実施した。その結果、2,4-DNT及びDAB投与群では両試験で小核含有肝細胞（MNHEP）頻度の有意な増加が認められた一方、CFB投与群では肝臓小核試験のみで増加が認められた。しかしながら、肝臓小核試験において分裂細胞数の増加が認められなかったことは、前処理過程における細胞破壊とそれに伴うアーティファクトが生じていることを示唆しており、肝臓小核試験の結果については再現性の確認が必要と考えられた。さらに、新規小核マーカー候補としてcGAS及びPolqを検討した結果、Polqは一部の細胞で陽性を示したものの、小核マーカーとしての有用性は限定的であった。以上より、HMN assayは遺伝毒性肝発がん物質の検出に有用であることが示されたが、一部の非遺伝毒性肝発がん物質には適用困難である可能性が示唆され、今後さらなる検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）における優先評価化学物質のリスク評価（一次）では、遺伝毒性試験の情報が存在するにもかかわらず、発がん性試験結果が得られていない優先評価化学物質については、発がん性の定量的評価を行うことができない。そのため、優先評価化学物質に指定された閾値なし発がん性の懸念を有する物質が評価Ⅱ段階に停滞しないよう、多数の動物、長期間、及び多大な費用を要する発がん性試験に代わる、新たな発がん性定量的評価手法の開発と確立が求められている。

染色体不安定性や細胞分裂異常の結果生じる小核は、化学物質の安全性評価におい

て古くから染色体異常の指標として用いられてきたが、小核そのものの意義や、小核を有する細胞に及ぼす影響については十分に理解されていなかった。しかし近年、chromothripsisと呼ばれる現象が報告され、小核そのものが発がんの原因になりうるということが明らかになってきた¹⁻³⁾。Chromothripsisは、小核の核膜崩壊に伴う染色体粉砕と再構成によって生じる劇的な遺伝子変異であり、一度に複数のがん関連遺伝子の発現変化を引き起こすと考えられている。さらに、小核の発がんへの関与を裏付けるように、ラット肝臓小核試験の結果が遺伝毒性の有無にかかわらず肝発がん性と高い相関を示すことが報告されており⁴⁾、化学発がんの根底には染色体不安定性が関与している可

能性が示唆されている。このような背景から、本研究では、染色体不安定性を指標とした発がん性の定量的評価法として、病理組織学的手法による小核検出法 (HMN assay) を用いた肝発がん性評価を提案する。

HMN assayは、令和4年度厚生労働行政推進調査事業費補助金「化審法における発がん性定量評価を見据えた新たな遺伝毒性評価技術構築のための基盤研究」において構築した新たな小核検出法である。本法は、抗 γ -H2AX抗体を用いた免疫組織化学染色 (IHC) により陽性を示した小核を計数するもので、ラットを用いた28日間反復投与毒性試験で得られたパラフィン切片を用いて実施する。これまでに種々の小核誘発物質を用いて検討した結果、従来の肝臓小核試験と比較して、前処理が簡便であること、小核の判定が容易であること、対照群における小核含有肝細胞 (micronucleated hepatocyte; MNHEP) 頻度の再現性が高いこと、幅広い用量範囲で用量相関性が認められる等の利点を確認されている。また、本法は肝臓以外の臓器への応用や、過去に実施された毒性試験のホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) 試料を用いた評価への応用も期待される。一方、抗 γ -H2AX抗体を用いたIHCでは、小核以外にもDNA損傷細胞、アポトーシス細胞及び有糸分裂細胞などが陽性を呈するため、小核の計数には形態学的判別が必要となる。また、将来的な画像解析システムによる自動化においても、これら陽性像が障害となる可能性がある。

本研究では、HMN assayの肝発がん性評価法としての有用性評価に加え、より特異性の高い新規小核マーカーの探索を実施した。令和7年度は、遺伝毒性肝発がん物質2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT), *p*-dimethylnitroazobenzene (DAB) と、非遺伝毒性肝発がん物質clofibrate (CFB) について、HMN assayによる評価を行った。さらに、新規小核マーカー候補としてcGAS及びPolqタンパク質について、その有用性を検討した。

B. 研究方法

B-1. HMN assayの有用性評価

B-1-1. 材料および試薬

2,4-DNT (>99.0%), DAB (>98.0%) 及びCFB (>98.0%) は東京化成工業 (東京) から購入した。

B-1-2. 動物実験

雄性5週令のF344ラットを日本エスエルシー株式会社より購入し、CRF-1粉末基礎飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) と水道水で飼育した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 換気回数18回/時 (オールフレッシュ), 12時間蛍光灯照明/12時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに5匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い、週2回交換を行った。また、飼料及び水道水は試験期間中、自由に摂取させた。一週間の馴化期間の後、ラット20匹を各群5匹に配し、対照群と2,4-DNT, DNB及びCFB投与群の計4群を設けた。2,4-DNTは100 mg/kg体重/日, DNBは100 mg/kg体重/日, CFBは400 mg/kg体重/日の用量で28日間強制経口投与した。対照群には溶媒として用いたコーン油を投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週1回、一般状態観察を連日実施した。最終投与の翌日にイソフルラン麻酔下にて腹部大動脈より放血し、肝臓を採取し、重量測定後、一部を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、病理組織学的検索又はHMN assayに供した。

B-1-3. 肝臓小核試験

10%中性緩衝ホルマリン液で固定した肝組織を用いた。2~3 mm大にカットした肝組織10個を12N水酸化カリウム溶液に入れ、室温で16時間インキュベーションし、洗浄

後、水でホモジナイズした。遠心分離後、10%中性緩衝ホルマリンで洗浄し、固定した。細胞懸濁液をSYBR Goldで染色し、蛍光顕微鏡で観察した。2000個の肝細胞（HEPs）をカウントし、そのうちMNHEPsの割合を算出した。

B-1-4. HMN assay

10%中性緩衝ホルマリン液で固定後にパラフィン包埋した肝組織標本を薄切した組織切片を使用した。キシレン、無水エタノールにて脱パラフィンした後、クエン酸緩衝液（関東化学、東京）を用いたオートクレーブ処理により抗原を不活化した。3% H_2O_2 にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、1次抗体として抗 γ -H2AXマウスモノクローナル抗体（Cell Signaling Technology, 米国）を用い、4°Cで一晩インキュベートした。Phosphate-buffered salineにて洗浄後、2次抗体としてヒストファイン シンプルステインマウス一次抗体用（ニチレイバイオサイエンス）を用いて30分間インキュベートした。発色にはdiaminobenzidineを用いた。

小核形成頻度の計測にはBX51システム生物顕微鏡（オリンパス、東京）を用い、肝臓の中葉のMNHEPをカウントした。さらに、Aperio AT2（Leica Biosystems, ドイツ）を用いてバーチャルスライドの作成を行い、画像解析ソフトウェアHALO（indicalabs, 米国）にて中葉の総核数を算出した。MNHEPを総核数で除することでMNHEPの割合を算出した。

B-1-5. 統計学的解析

肝臓小核試験の統計学的解析には、Kastenbaun and Bowman's tableによる条件付き二項検定を用いた。最終体重、臓器重量およびHLMN assayの統計学的解析には、Bartlett検定により分散の均一性を検定し、分散が均一であった場合はDunnnett検定を用いた。分散が均一でなかった場合はSteel検定を用いた。

B-2. 新たな小核マーカーの検索

IHCには、N-nitrosodipropylamineを20 mg/kg体重/日の用量で、28日間反復投与したラット肝臓の10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。キシレン、無水エタノールにて脱パラフィンした後、クエン酸緩衝液（関東化学、東京）を用いたオートクレーブ処理により抗原を不活化した。3% H_2O_2 にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、cGAS及びPolqの染色には正常ウサギ血清（ニチレイバイオサイエンス、東京）、その他の染色には正常ヤギ血清（ニチレイバイオサイエンス）を用いてブロッキングを行った。1次抗体として、Invitrogen社製（米国）抗cGAS及び抗POLQラビットポリクローナル抗体を用い、4°Cで一晩インキュベートした。Phosphate-buffered salineにて洗浄後、2次抗体にはヒストファイン ウサギ一次抗体用（ニチレイバイオサイエンス）を用いて30分間インキュベートした。発色にはdiaminobenzidineを用いた。

（倫理面の配慮）

動物を用いた実験は、所属機関における「動物実験の適正な実施に関する規定」、わが国における「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」ならびに厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して行った。加えて、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護を配慮の上で実施した。

C. 研究結果

C-1. HMN assayの有用性評価

試験期間中の体重の推移及び摂餌量の推移をFigure 1に示す。いずれの投与群においても、投与2週目以降に体重増加抑制が認められた。2,4-DNT投与群では摂餌量の減少が見られたが、その他の群では明らかな

変化は認められなかった。最終体重はいずれの投与群においても対照群と比較して有意な低値を示した (Table 1)。一方、肝実重量は全ての投与群で増加傾向を示し、肝比重量は有意に増加した。病理組織学的検索の結果、2,4-DNT投与群ではオーバルセル過形成、単細胞壊死の増加及び空胞変性が認められ、CFB投与群ではびまん性の肝細胞肥大及び顆粒状変性が認められた。一方、DAB投与群では明らかな変化は認められなかった (Table 2)。

肝臓小核試験では、いずれの投与群においても対照群と比較してMNHEP頻度の有意な上昇が認められたが (Fig. 2A)、分裂細胞頻度に変化は認められなかった (Fig. 2C)。一方、HMN assayでは、2,4-DNT投与群およびDAB投与群においてMNHEP頻度の有意な上昇が認められたが、CFB投与群では変化は認められなかった (Fig. 2B)。また、分裂細胞頻度は2,4-DNT投与群及びDAB投与群において有意に上昇した (Fig. 2D)。

C-2. 新たな小核マーカーの検索

抗cGAS抗体を用いたIHCの結果、陽性を示す小核は認められなかった。一方、抗POLQ抗体を用いたIHCでは、小核様の陽性構造物を有する肝細胞が散見された (Fig. 3A)。さらに、蛍光免疫染色による γ -H2AXとPolqの二重染色の結果、一部の γ -H2AX陽性小核においてPolq陽性像が認められたが、Polq陰性の γ -H2AX陽性小核も認められた (Fig. 3B)。

D. 考察

D-1. HMN assayの有用性評価

遺伝毒性肝発がん物質である2,4-DNT及びDAB、ならびに非遺伝毒性肝発がん物質であるCFBを用いて、HMN assayの有用性について検討した。その結果、2,4-DNT及びDAB投与群では、肝臓小核試験及びHMN assayのいずれにおいてもMNHEP頻度の有意な増加が認められ、小核誘発物質と

して検出可能であった。一方、CFB投与群では、肝臓小核試験で有意な増加が認められたのに対し、HMN assayでは明らかな変化は認められなかった。前処理を必要としないHMN assayに対し、肝臓小核試験ではアルカリ処理後にホモジナイズを行うことから、組織傷害を伴う試料では細胞破壊が生じやすく、アーティファクトが生じる可能性がある。実際に、2,4-DNT及びDAB投与群では、HMN assayにおいて分裂細胞数の増加が認められた一方、肝臓小核試験では同様の変化は認められず、分裂細胞が前処理過程で破壊されている可能性が考えられた。また、HMN assayではIHCを用いて γ -H2AX陽性の小核を検出するのに対し、肝臓小核試験では核染色のみを用いて小核を検出することから、アーティファクトによる小核の誤検出が生じやすい。このため、肝臓小核試験については再解析を実施し、本結果の再現性について検討する予定である。

HMN assayによる肝発がん性評価の可能性について、本結果は、2,4-DNT及びDABの様な遺伝毒性肝発がん物質の検出が可能であるのに対し、CFBの様な一部の非遺伝毒性肝発がん物質を検出できない可能性を示すものであった。一方、過去に実施した検討では、thioacetamideやmethapyrileneといった非遺伝毒性肝発がん物質の検出が可能であったことを考慮すると、今後はさらに多様な非遺伝毒性肝発がん物質を用いた検討を行い、本法の適用範囲と限界を明らかにする必要があると考えられた。

D-2. 新たな小核マーカーの検索

抗POLQ抗体を用いたIHCの結果、一部の小核は陽性を呈し、小核で生じた染色体粉砕に応答してPolqが集積することが示唆された。しかしながら、 γ -H2AXに陽性にも関わらず、Polqに陰性の小核も多数認められたことから、小核マーカーとしての有用性は低いと考えられた。

E. 結論

本研究により，HMN assayは2,4-DNT及びDABのような遺伝毒性肝発がん物質を検出可能であり，肝発がん性評価法として有用であることが示された．一方，CFBでは明らかな変化が認められず，一部の非遺伝毒性肝発がん物質は検出できない可能性が示唆された．また，HMN assayは前処理に伴う細胞破壊やアーティファクトの影響を受けにくく，従来の肝臓小核試験を補完し得る手法と考えられる．さらに，Polqは一部の小核で発現が認められたものの， γ -H2AX陽性小核との一致性に乏しく，小核マーカーとしての有用性は限定的であると考えられた．

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Mitsumoto T., Ishii Y., Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Toyoda T., Ogawa K. Evaluation of 2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramide by a comprehensive toxicity study using gpt delta rats. Toxicol. Appl. Pharm. 507, 117686 (2026)
2. Takimoto N., Ishii Y., Mitsumoto T., Takasu S., Namiki M., Toyoda T., Shibutani M., Ogawa K. Involvement of nuclear atrophy of binucleated hepatocytes in the large micronucleus formation induced by rat hepatocarcinogen acetamide. Toxicol. Appl. Pharm. 496, 117243 (2025).

G.2 学会発表

1. 石井雄二，瀧本憲史，山上洋平，高須伸二，相馬明玲，豊田武士，渋谷 淳，小川久美子：ラットを用いたカルバミン酸メチルのin vivo遺伝毒性評価．日本食品

化学学会第31回総会・学術大会，滋賀（2025.6）

2. 山上洋平，石井雄二，中村賢志，原島洋文，高須伸二，相馬明玲，豊田武士，村上智亮，小川久美子：アセトアミド誘発ラット肝腫瘍で見られた染色体外環状DNAの特徴とクロモスリプシスの関与．第52回日本毒性学会学術年会，沖縄（2025.7）
3. 石井雄二：クロモスリプシスによるラット肝発がん機序の解明．がん予防学術大会2025，名古屋（2025.9）
4. 相馬明玲，石井雄二，山上洋平，高須伸二，豊田武士，小川久美子：アセトアミドの大型小核形成に関わる構造的特徴の検討．第52回日本毒性学会学術年会，沖縄（2025.7）
5. 山上洋平，石井雄二，高須伸二，相馬明玲，豊田武士，村上智亮，小川久美子：アセトアミド誘発大型小核によるクロモスリプシス様染色体再構成と肝発がんへの寄与．第54回日本環境変異原ゲノム学会，静岡（2025.11）
6. 山上洋平，石井雄二，高須伸二，相馬明玲，豊田武士，村上智亮，小川久美子：アセトアミドのラット肝発がんに寄与する肝細胞質内封入体の形成機構．第42回日本毒性病理学会，名古屋（2026.1）
7. 石井雄二，山上洋平，高須伸二，相馬明玲，豊田武士，小川久美子：Acetamideのラット肝発がんに寄与する大型小核の形成機序．日本薬学会第146年会，大阪（2026.3）

H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む．）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

参考文献

- 1) Zhang CZ., Spektor A., Cornils H., Francis JM., Jackson EK., Liu S., Meyerson M., Pellman D. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature* 2015, 522, 179-184, DOI:10.1038/nature14493.
- 2) Stephens PJ., Greenman CD., Fu B., Yang F., Bignell GR., Mudie LJ., et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development.

Cell 2011, 144, 27-40, doi: 10.1016/j.cell.2010.11.055.

- 3) Cortes-Ciriano I., Lee JJ., Xi R., Jain D., Jung YL., Yang L., et al. Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. *Nat. Genet.* 2020, 52, 331-341, doi: 10.1038/s41588-019-0576-7.
- 4) Hamada S., Shigano M., Wako Y., Kawasako K., Satomoto K., Mitsumoto T., Fukuda T., Ohyama W., Morita T., Hayashi M. Detection of hepatocarcinogens by combination of liver micronucleus assay and histopathological examination in 2-week or 4-week repeated dose studies. *Genes Environ.* 2022, 44, doi: 10.1186/s41021-021-00222-1.

Table 1. Body and organ weights data for F344 rats treated with test compounds for 4 weeks

	Control	2,4-DNT	DAB	CFB
No. of animals	5	5	5	5
Body weight	234.0 ± 13.3 ^a	190.1 ± 8.9**	204.2 ± 12.1**	206.1 ± 11.5**
Absolut liver weight (g)	7.02 ± 0.67	7.70 ± 0.48	7.36 ± 0.72	13.59 ± 0.80**
Relative liver weight (g/100gBW)	2.99 ± 0.12	4.05 ± 0.09**	3.60 ± 0.20**	6.60 ± 0.10**

^a Mean ± SD*, **Significantly different from the control group at $p < 0.05$, 0.01 , respectively.

Table 2. Histopathological findings in rat liver treated with materials for 4 weeks.

Findings(±, +, ++, +++)	Control	2,4-DNT	DAB	CFB
No. of animals	5	5	5	5
Hypertrophy, hepatocyte, diffuse	0	0	0	5(0/3/2/0)
Oval cell hyperplasia	0	5(2/3/0/0)	0	0
Apoptosis	0	5(0/3/2/0)	0	0
Vacuolar, hepatocyte, diffuse	0	5(0/0/5/0)	0	0
Granular degeneration, hepatocyte, diffuse	0	0	0	5(0/5/0/0)

Grade: ±, minimal; +, slight; ++, moderate; +++, marked

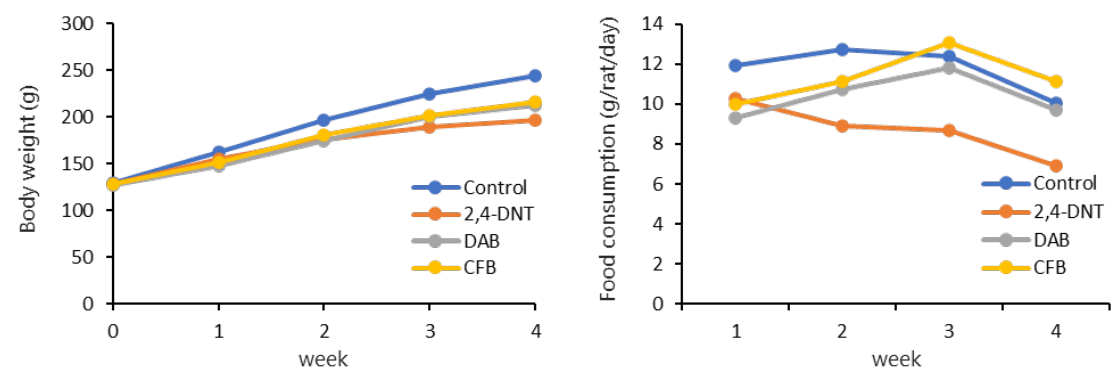


Figure 1. Body weight and food consumption for F344 rats treated with test compounds for 4 weeks

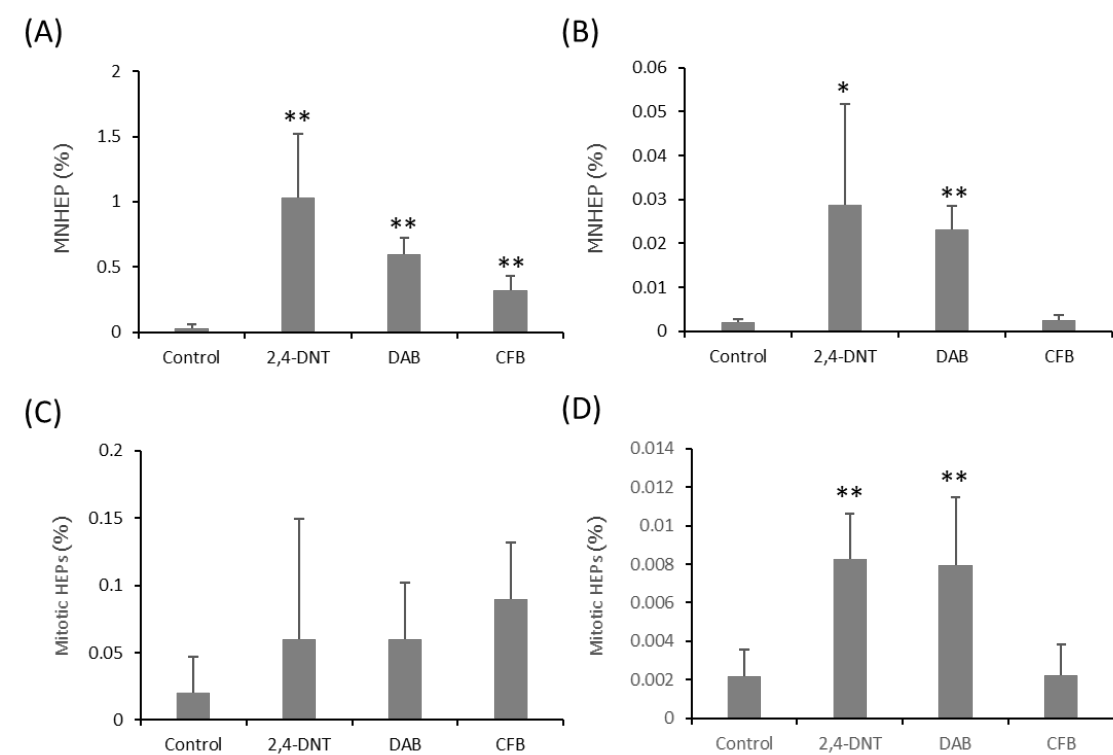


Figure 2. Comparison of the liver micronucleus assay and HMN assay in the livers of F344 rats treated with test compounds for 4 weeks. Frequencies of MNHEPs in the liver micronucleus assay (A) and HMN assay (B), and frequencies of mitotic HEPs in the liver micronucleus assay (C) and HMN assay (D).

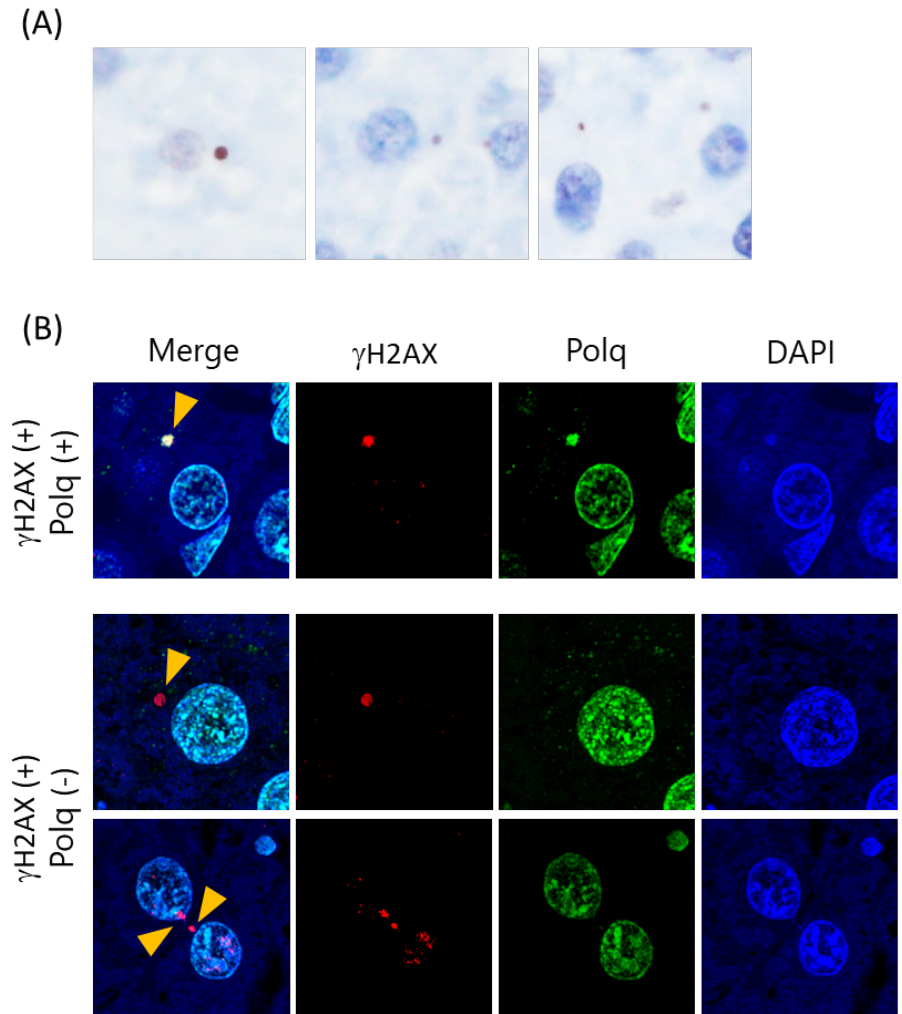


Figure 3. Representative images of immunohistochemical and immunofluorescence staining of micronucleus in the liver of F344 rats treated with N-nitrosodipropylamine at 20 mg/kg/day for 4 weeks. Representative images of Polq-positive micronuclei (A), and representative images of immunofluorescence staining for γ -H2AX and Polq (B).

令和7年度 厚生労働科学研究費 補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
分担研究課題名: ecNGS法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の
開発

研究分担者：杉山圭一、鈴木 孝昌、諸角涼介

所属 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター ゲノム安全科学部

研究要旨

本研究では、error-corrected next generation sequencing (ecNGS) 法を用いた発がん性予測に資する in vivo 遺伝毒性評価法の開発を目的として、ラット試料における用量反応性評価への適用可能性を検証し、併せてFFPEサンプルへの展開に向けた基盤整備を行った。R7年度は、既存研究で用量反応性が示されているエレミシン投与ラット試料を対象にECS解析を実施した。その結果、変異頻度は用量依存的に増加し、エレミシンに特徴的な T>A および T>C の変異スペクトルにも用量反応性が認められた。これにより、ECS解析がラット試料における in vivo 変異原性を定量的に評価し得る可能性が示された。また、次年度以降のFFPEサンプル解析に向け、キノリン曝露 gpt delta ラット肝臓FFPEサンプルを確保し、用量反応評価およびgptアッセイとの比較が可能な基盤を整備した。さらに、DNA抽出条件比較用のFFPE試料を入手し、PacBio Revio のHiFiリードやIllumina社以外のショートリードシーケンサーを用いたecNGS法の技術的展開可能性を検討した。以上より、R7年度はecNGS法の in vivo 用量反応性評価への有用性を示すとともに、FFPEサンプルを用いた本格的解析に向けた試料・技術基盤を整備した。今後は、FFPE由来DNAの品質評価および解析条件の最適化を行い、発がん性予測手法としての妥当性検証へ展開する。

A. 研究目的

先行研究においてラットサンプルに対し ecNGS法が応用可能であることが示されている。本課題においては、R7年度は、先行研究に引き続き用量反応性に関するデータ取得を継続行った。さらに、ecNGS法のFFPEサンプルに対する応用可能性を来年度以降で検証するため、FFPEサンプルを提供いただける組織を調査し、ラット肝臓サンプルの入手に成功するとともに、サンプルの処理方法について検討した。

B. 研究方法

R7年度は、まず in vivo における用量反応性評価へのecNGS法（ECS解析）の適用可能性を検証するため、既存研究において用量

反応性が示されているエレミシンを対象とした解析を実施した。エレミシン投与ラット試料を用い、変異頻度および変異スペクトルの用量依存性を評価することで、ラット試料におけるECS解析の有効性を確認する設計とした。

加えて保存組織への応用を見据え、ecNGS法をホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルへ展開するための基盤整備を進めた。具体的には、固定条件や処理履歴が明確で既存の遺伝毒性データ（gptアッセイ等）と比較可能なサンプル、あるいは作成条件が規定された試験用サンプルを候補とし、解析目的に最も適したサンプル条件を評価した。併せて、PacBio社RevioによるHIFI

リードを用いたECS法応用可能性をデモデータで評価したほか、既存サンプル（ジエチルニトロソアミン処理gptデルタラット肝臓）を用いて、HIFIリードデータを取得した。Illumina社以外の3種のショートリードシーケンサー（DNBSEQ、AVIT、SBX）について原理およびデータ特性を検討し、PECC-seq性能向上への有効性を検証した。

（倫理面の配慮）

動物を用いた実験は、所属機関における「動物実験の適正な実施に関する規定」、わが国における「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」ならびに厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して行った。加えて、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護を配慮の上で実施した。

C. 研究結果

「ecNGS法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」については、R7年度は、まず *in vivo* における用量反応性評価へのECS解析の有用性を検証した。過去の研究において用量反応性が示されているエレミン投与ラット試料を用いてECS解析を行った結果、エレミン投与群において変異頻度は用量依存的に増加することが確認された(図1)。また、エレミンに特徴的とされる T>A および T>C の変異スペクトルについても、用量反応性が認められた(図2)。これらの結果から、ECS解析がラット試料における *in vivo* 変異原性評価に有用である可能性が示唆された。さらに次年度にecNGS法をFFPEサンプルへ適用するための実験体制を整備した。キノリン曝露 gpt delta ラット肝臓 FFPE (3用量+対照) が提供され、用量反応評価およびgpt アッセイとの比較を可能とする基盤が確立した。また、抽出条件比較に用いる別ロットFFPEも確保した。さら採用する

ecNGS手法として長鎖リード技術では、PacBio社RevioのHIFIリードがECS法に有用である可能性を検討し、初期設定変更により相補鎖ごとのコンセンサス配列等が取得可能であることをデモデータで確認した。また、既存サンプルを用いて、RevioシーケンサーによるHiFiデータを取得した。DNA断片化として、酵素処理及びビーズ精製による方法を検討したが、どちらもリードの冗長度として適切なデータが得られることが確認できた。得られたHIFIリードからのECSデータ解析法の確立に着手した。ショートリードでは、PECC-seq性能向上を目的に複数機種を評価し、DNBseq及びAVITIシーケンサーについて適応可能性を検討した。両機種とも原理的にシーケンス精度の向上が見込まれ、実データでもIlluminaシーケンサーと比較してエラーの低減が確認できたが、シーケンスプライマーの配列により、相補鎖両鎖のリードの回収が難しいことが判明した。このことよりPECC-seqへの応用が難しいことがわかったが、PCRを用いる他のECS法への応用は可能であり、実際にHawk-Seq法においてDNBseqが使用可能であることを確認した。最近になってRoche社が新たな原理に基づく次世代シーケンサーSBXを開発したという情報を入手し、原理的にシーケンスの正確度が上がることからECS法への応用が期待されるため、来年度引き続き検討を行うこととした。

D. 考察

「ecNGS法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」について、R7年度は主として ecNGS 法の *in vivo* 用量反応性評価に対する有効性検証と、FFPE サンプルへの展開に向けた基盤整備を行った。エレミン投与ラット試料において、変異頻度および特異的な変異スペクトル (T>A、T>C) が用量依存的に増加したことは、ECS解析が生体内における変異原

性を定量的に捉え得ることを示す重要な知見である。特に、既存の遺伝毒性知見と整合する結果が得られたことから、本手法が発がん性評価に資する指標として機能する可能性が示唆された。

一方、FFPE サンプルでは、ホルマリン固定に伴う架橋構造や人工的塩基修飾に起因するシーケンスエラーが大きな課題となる。本年度は、こうした制約を踏まえた技術的整理を行い、比較可能な FFPE サンプル確保および解析条件検討の方向性を明確化した。今後、抽出法や前処理条件の最適化を通じてアーティファクトを低減できれば、保存試料を活用した遺伝毒性評価の適用範囲が大きく拡張されると期待される。また、PacBio HiFi リードの活用により、従来法では困難であった解析への展開も視野に入る。

さらに、PECC-seqへの応用としては、ロッシュ社の最新機種であるSBXに期待がかかる。

E. 結論

「ecNGS法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」では、R7年度において、まず in vivo 用量反応性評価に対する ECS 解析の有効性を検証し、加えて FFPE サンプルへの展開に向けた研究基盤を整備した。過去の研究において用量反応性が示されているエレミン投与ラット試料に対する ECS 解析により、変異頻度および特異的な変異スペクトルが用量依存的に変化することが確認され、本手法がラット試料における変異原性を定量的に評価し得る可能性が示された。

これらの知見を踏まえ、保存試料を対象とした応用展開として、キノリン曝露 gpt delta ラット肝臓 FFPE サンプルおよび検討用 FFPE 試料を確保し、次年度に予定する DNA 抽出条件の比較試験やライブラリ調製条件最適化に向けた体制を構築した。以上より、本年度は、ecNGS 法を用いた in vivo 遺伝毒性評価の有効性を示すとともに、

FFPE サンプルでの本格的解析に向けた基盤整備を完了した。今後は、R8年度における FFPE 由来 DNA 特性の定量評価および解析条件の最適化を経て、R9年度の ecNGS 法による FFPE 解析と発がん性予測手法としての妥当性検証へと展開する計画である。従来の PECC-seq での検討に加え、PacBio 社の HiFi リードを用いた手法が、FFPE 由来サンプルを含めた ECS 法として有望である可能性を示すデータが得られたため、今後さらにデータ解析手法の確立を含めた検討を進めたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Morozumi R, Shimizu N, Amimoto T, Yamamoto J, Tsuda M. A chemical labeling method for selective conjugation to DNA 3'-phosphoglycolate termini. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2026. doi:10.1080/15257770.2026.2645371.
2. Yauk CL, et al. Application of error-corrected sequencing technologies for in vivo regulatory mutagenicity assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2026;164:1059.
3. 鈴木孝昌. Error-corrected next generation sequencing (ecNGS) の現状. *毒性質問箱*. 2025;27:50-55.
4. Honda H, Suzuki T, Kitajima M, Kondo NI, Miyata K, Utsumi S, Yamada M. The new era shaped by environmental genome monitoring - symposium of the Japanese environmental mutagen and genome society (JEMS), 2024. *Genes Environ*. 2025, 47: 6.
5. Matsumura S, Hosoi S, Hirose T, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Kawade A, Hakura A, Kakiuchi D, Asakura S, Koyama N, Okada Y, Chikura S, Kimoto T, Masumura K, Suzuki T, Sugiyama KI. Whole genome mutagenicity evaluation using Hawk-Seq™

demonstrates high inter-laboratory reproducibility and concordance with the transgenic rodent gene mutation assay. Genes Environ. 2025, 47: 13.

G.2. 学会発表

1. 鈴木孝昌, 三島雅之, 笠原杏奈, 最上由香里, 高橋華奈子, 佐藤薫, 杉山圭一. ナノボアシークエンサーを用いた簡便迅速な DNA メチル化解析. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
2. 伊澤和輝, 津田雅貴, 諸角涼介, 杉山圭一. ラットサンプルを用いた ECS 解析による用量反応性の検討. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
3. 諸角涼介, 清水直登, 石庭寛子, 井出博, 津田雅貴. ネットアイツメガエルを用いた低線量率放射線による DNA 修復機構依存的影響の解析」日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
4. Ryosuke Morozumi, Naoto Shimizu, Hiroko Ishiniwa, Hiroshi Ide, Masataka Tsuda. Radiation sensitivity dependent on DSB repair mechanism in Xenopus embryos. The 68th Annual Meeting of the Japanese Radiation Research (2025.10)
5. 降旗千恵, 杉山圭一. 鈴木孝昌. 遺伝毒性肝発がん物質の予測に有用な 4 マーカー遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) 第 84 回日本癌学会学術総会, 金沢市 (2025.9)
6. 鈴木孝昌, 三島雅之, 佐藤薫, 杉山圭一. 動物細胞を用いた DNA メチル化検出法の検討, 日本農芸化学会 2026 年度大会, 京都市 (2026.3)
7. 最上由香里, 高橋華奈子, 鈴木孝昌, 伊澤和輝, 三島雅之, 柳井修一, 堀端克良, 小泉修一, 杉山圭一, 佐藤薫, 神経細胞、ミクログリアにおける細胞老化にともなうゲノム変化と表現系の解析, 日本薬理学会第 99 回年会, 仙台市 (2026.3)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

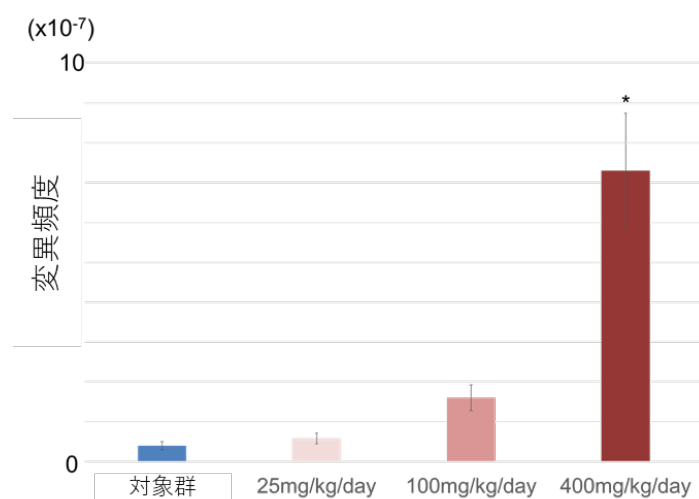


図1 ECS解析によって検出された、エレミシン投与群の変異頻度の上昇

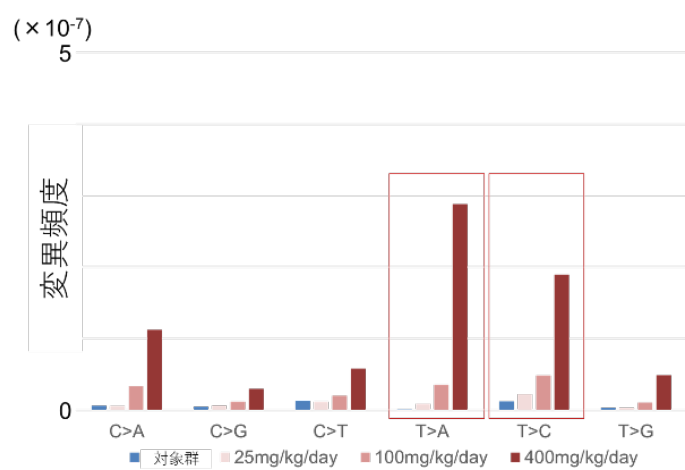


図2 ECS解析によるエレミシンに特徴的な変異の検出

令和7年度 厚生労働科学研究費 補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
分担研究課題名: 発がん性試験と遺伝毒性試験の相互相関性の相関解析

研究分担者：魏 民

所属 大阪公立大学 大学院医学研究科・准教授

研究要旨

本分担研究では、遺伝毒性の無作用量がみられる低用量域における *in vivo* 変異原性と発がん性の用量相関関係に DNA 損傷応答（DNA damage response: DDR）が重要な影響を与えるとの仮説に基づき、既存の発がん性試験で得られたラット肝組織を活用して、発がん性指標と DDR 関連反応との相互相関性を検討した。令和7年度は、ヘテロサイクリックアミンである MeIQx および IQ、ならびにニトロソ化合物である DEN を投与したラット肝組織を用い、7 種類の DDR 関連タンパク質（ γ -H2AX、p21^{Waf1/Cip1}、MOK、APE1、HP1 α 、PHLDA3、MYBL1）について免疫組織化学的解析を行った。その結果、 γ -H2AX 陽性細胞は MeIQx、IQ および DEN の高用量群で認められたものの、陽性率は低く、低用量域における発がん初期の DDR 反応を定量的に評価する指標としては感度に限界があることが示唆された。また、 γ -H2AX 以外の DDR 関連タンパク質では明確な陽性像は得られなかった。これらの結果から、発がん初期における DDR 反応は、肝臓全体に均一に生じるのではなく、特定の細胞集団に局在して生じる可能性が考えられた。そこで、新たに DEN 誘発ラット肝発がん実験を実施し、前がん病変形成期である 12 週および腫瘍形成期である 20 週の肝組織を対象として single-nucleus RNA-seq (snRNA-seq) 解析を行うことより、DDR 応答細胞集団の同定ならびに発がん性予測に有用な新規 DDR 関連遺伝子候補を進めた。12 週時点では DEN 用量依存的に GST-P 陽性細胞巢が認められ、10 ppm で前がん病変形成の立ち上がりが確認され、50 ppm では肝実質の大部分が GST-P 陽性を示した。さらに、12 週時点肝組織を用いた snRNA-seq 解析では、対照群と DEN 投与群との間で UMAP 上のクラスター分布に明らかな差異が認められた。DEN 投与群では、前がん病変関連マーカーである Gstp1 の発現を示す細胞集団が認められ、GST-P 陽性前がん病変に対応する細胞状態を単一核レベルで捉えられる可能性が示された。また、DDR 関連遺伝子群を統合した module score 解析により、DEN 応答性細胞集団における DDR 活性の上昇傾向が認められた。以上より、snRNA-seq 解析は、発がん初期における DDR 応答細胞集団の同定および発がん性予測に有用な新規 DDR 関連遺伝子候補の探索に有用である可能性が示された。今後、20 週時点の肝腫瘍の解析結果と統合し、発がん性の定量評価に資する新規 DDR マーカー候補の探索・検証を進める。

A. 研究目的

化学物質の定量的発がん性評価は、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）等における化学物質のリスク評価において、有害性評価値を導出するために重要である。通常、発がん性評価では、遺伝毒性試験の結果に基づいて変異原性の有無を判断し、さらに発がん性試験の結果を用いて発がんリスクの強さや用量反応性を評価する。しかし、実際には、遺伝毒性陽性と判断され発がん性の懸念があるにもかかわらず、長期発がん性試験などの定量評価に利用可能な情報が十分に得られていない化学物質も少なくない。このような場合、発がん性の有無や強さを科学的に判断することが困難となり、リスク評価上の大きな課題となる。

そのため、本研究班「定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究」では、従来の長期発がん性試験を補完し、より迅速かつ合理的に化学物質の発がん性を定量的に評価するため、ゲノム安全性の観点から新たな発がん性評価指標を探索・開発することを目的としている。特に、DNA 損傷応答（DNA damage response: DDR）、染色体不安定性、変異頻度、変異スペクトルなど、発がん過程の初期に生じるゲノム毒性関連反応を定量的に捉えることにより、発がん性試験結果との関連性を明らかにし、化学物質発がん性予測への応用可能性を検証することを目指している。

本分担研究では、この研究班全体の中で、既存の発がん性試験および遺伝毒性試験で得られた知見と、DDR 関連反応との相互相関性を明らかにする役割を担う。これまで

に実施してきた遺伝毒性肝発がん物質の低用量発がん性評価研究では、遺伝毒性物質であっても、DNA 付加体形成、DNA 損傷、DNA 修復、変異誘発、前がん病変形成および腫瘍形成の各段階で用量反応性が必ずしも同一ではないことが示されている。すなわち、非常に低用量域では DNA 付加体や DNA 損傷が生じて、DNA 修復機構や細胞周期制御などの生体防御応答により、変異誘発や前がん病変形成には直ちに結びつかない可能性がある。一方、DNA 損傷が修復能力や細胞応答の許容範囲を超える用量域では、変異頻度の上昇、前がん病変の増加、さらに腫瘍形成へ進展すると考えられる。

このような発がん過程において、DDR は DNA 損傷を感知し、DNA 修復、細胞周期停止、アポトーシス、細胞老化などを制御する中心的な応答である。そのため、DDR 関連分子や DDR 応答細胞集団を同定することは、単に DNA 損傷の存在を示すだけでなく、その損傷が生体内でどの程度発がん過程に結びつく可能性があるかを評価するうえで重要である。特に、低用量域において発がんリスクの立ち上がりを反映する DDR 指標を同定できれば、長期発がん性試験を補完する新たな定量的評価指標、さらには Point of Departure (POD) 設定に資する指標となる可能性がある。

そこで本研究では、既存の発がん性試験で得られたラット肝組織を活用し、前がん病変や腫瘍形成などの発がん性指標と DDR 関連分子との関連を明らかにするとともに、DDR 法等を適用して両者の定量的・定性的相関を検討することを目的とした。さらに、発がん性の定量評価に資する DDR 関連分子および DDR 応答細胞集団を探索・同定し、

DDR を指標とした発がん性定量評価に用いる新たな POD 設定方法の提案を目指した。

B. 研究方法

1. 既存ラット肝組織を用いた DDR 関連タンパク質の免疫組織化学的解析

これまでに実施した遺伝毒性肝発がん物質の 16 週間投与試験で得られたラット肝臓ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いた。対象物質は、ヘテロサイクリックアミンである MeIQx (2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline) および IQ (2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline)、ならびにニトロソ化合物である DEN (diethylnitrosamine) とした。解析対象には、F344 ラット、BigBlue ラットおよび *gpt* delta ラットを用いた既存試験由来の肝組織を含めた (表 1)。免疫組織化学的解析では、DDR 関連タンパク質として γ -H2AX、p21^{Waf1/Cip1}、MOK (MOK protein kinase)、APE1 (Apyrimidinic Endonuclease 1)、HP1 α (Heterochromatin Protein 1 alpha)、PHLDA3 (Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 3) および MYBL1 (MYB proto-oncogene like 1) の 7 分子を検討した。これらはいずれも、既報の遺伝子発現解析において遺伝毒性肝発がん性の予測に有用な mRNA マーカー候補として抽出された分子であり、タンパク質レベルでの可視化マーカーとしての適用可能性を検討した。

2. DEN 誘発ラット肝発がんモデルを用いた snRNA-seq 解析

免疫組織化学的解析では、検討した DDR 関連タンパク質について、低用量域におけ

る DDR 反応の検出感度に限界がある可能性が示された。そのため、新たに DEN 誘発ラット肝発がん実験を実施し、より高感度に遺伝毒性および発がん性の予測に有用な新規 DDR 関連遺伝子候補の同定を試みた。

6 週齢雄性 F344 ラットに DEN を 0 (対照群)、1、10 および 50 ppm の 4 用量で飲水投与し、12 週を発がん早期 (前がん病変形成期)、20 週を腫瘍形成期として肝組織および肝腫瘍を採取する計画とした。各時点の肝組織および肝腫瘍を対象に、single-nucleus RNA-seq (snRNA-seq) 解析を実施し、DEN 応答性の高い DDR 関連遺伝子を発現する肝細胞集団を同定するとともに、新規 DDR マーカー候補を探索することとした。また、本研究で得られた肝組織、肝腫瘍および snRNA-seq 解析データは、研究班全体における新規 DDR 評価法の適用検証にも活用可能であり、必要に応じて各分担研究班へ材料を提供するとともに、各分担研究班で開発された新規 DDR 関連分子の有用性検証にも協力する計画である。

12 週時点の肝組織については、前がん病変マーカーである glutathione S-transferase placental form (GST-P) 免疫染色を実施し、DEN 投与による前がん病変形成の用量反応性を評価した。さらに、前がん病変形成の立ち上がり用量および DDR 応答細胞集団の解析に適した高用量条件を確認した。

3. DEN 誘発ラット肝発がんモデルを用いた single-nucleus RNA sequencing 解析

DEN 誘発ラット肝発がんモデルにおける DDR 関連細胞集団および新規 DDR マーカー候補を探索するため、snRNA-seq 解析を実

施した。本年度は、無処置群（対照群）および 50 ppm DEN の 12 週投与後の肝組織を対象として解析を行った。

採取した肝組織から単離核懸濁液を調製し、BD Rhapsody システムを用いて核および barcoded beads をロードした。各核由来 mRNA を barcoded beads に捕捉し、逆転写により cDNA を合成した後、whole transcriptome amplification (WTA) により増幅した。増幅産物はビーズ精製によるサイズセクションを行い、MultiNA システムを用いてライブラリのサイズ分布を確認した。続いて、NEBNext Ultra II FS Library Prep Kit を用いて DNA 断片化およびアダプター・バーコード付加を行い、MGIEasy Universal Library Conversion Kit による conversion および circularization を経て DNB を作製し、DNBSEQ-T7 によりシーケンスを実施した。

取得した fastq データは、Cutadapt によりアダプタートリミング、ホモポリマートリミングおよびクオリティフィルタリングを行った後、STARsolo version 2.7.10b を用いてラット参照ゲノム mRatBN7.2_107_nosmRNA へマッピングした。遺伝子 symbol ごとに各核の遺伝子発現カウントテーブルを作成し、R の DropletUtils package および Dropkick package を用いて低品質バーコードおよび background を除外した。Tag 情報に基づく demultiplex 解析により各検体由来の核を識別し、得られた発現マトリックスを用いて RStudio にて DEN 応答性細胞集団および DDR 関連遺伝子発現の解析を行った。

（倫理面の配慮）

動物を用いた実験は、大阪公立大学にお

ける「動物実験の適正な実施に関する規定」ならびにわが国における「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」に準拠して行った。加えて、大阪公立大学による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護を配慮の上で実施した。

C. 研究結果

1. DDR 関連タンパク質の免疫組織化学的解析

MeIQx、IQ および DEN を投与した既存ラット肝組織を用いて、7 種類の DDR 関連タンパク質の発現を免疫組織化学的に検討した（図 1）。その結果、 γ -H2AX 陽性細胞は、MeIQx 100 ppm 群、IQ 100 ppm 群および DEN 10 ppm 群などの高用量群において認められた。一方で、いずれの物質においても γ -H2AX 陽性率は低く、低用量域における DDR 反応を定量的に評価するには十分な感度が得られない可能性が示された。 γ -H2AX 以外の 6 分子（p21^{Waf1/Cip1}、MOK、APE1、HP1 α 、PHLDA3、MYBL1）については、本研究の検討条件下では明確な陽性像は得られなかった。したがって、これらの分子は mRNA レベルでは遺伝毒性肝発がん性の予測マーカーとして有用性が示唆されるものの、免疫組織化学的手法によるタンパク質発現の可視化マーカーとしては、少なくとも本検討条件では発がん初期の DDR 反応を捉える感度に限界があると考えられた。

2. DEN 誘発ラット肝発がんモデルの 12 週時点における病理学的評価

DEN 誘発ラット肝発がんモデルでは、12 週時点において 0 ppm、1 ppm および 10 ppm 群では肉眼的に明らかな異常所見は認められなかった。一方、50 ppm 群では肝臓に多

数の結節が認められた (図 2A)。

GST-P 免疫染色では、DEN 投与量に依存して GST-P 陽性細胞巢が増加した (図 2B)。1 ppm 群では対照群と比較して明確な差は認められず、散発的な単細胞陽性が主体であった。10 ppm 群では 10 細胞以上からなる GST-P 陽性細胞巢が出現し、前がん病変形成の立ち上がり用量に相当すると考えられた。50 ppm 群では肝実質の 80%以上が GST-P 陽性を示し、前がん病変に由来する細胞状態を高頻度に回収できることから、DDR 応答細胞集団の同定を目的とした snRNA-seq 解析に適した条件であると考えられた。

3. DEN 誘発ラット肝発がんモデルにおける snRNA-seq 解析

DEN 誘発ラット肝発がんモデルの 12 週時点肝組織を用いて、snRNA-seq 解析を実施した。解析対象は、対照群由来 3 サンプルおよび 50 ppm DEN 投与群由来 3 サンプルであった。全サンプルを統合して UMAP 解析を行ったところ、対照群由来サンプルと DEN 投与群由来サンプルの間で明らかなクラスター分布の差異が認められた。特に、DEN 投与群では対照群と比較して特定のクラスターが増加または新たに出現しており、DEN 曝露に伴う肝細胞状態の変化を反映していると考えられた。現時点の解析では、DEN 投与に関連するクラスターとして、Cluster 3、7、8、11、14、17、25、および Cluster 0、12、27 が抽出された (図 3)。

次に、各クラスターのマーカー遺伝子発現に基づき、細胞集団のアノテーションを行った。その結果、主要な細胞集団として、正常肝細胞集団、DEN 応答性肝細胞集団、

DEN 応答性前駆細胞様集団、内皮細胞集団、胆管細胞様集団、免疫細胞集団および星細胞集団が同定された。DEN 投与群では、Gstp1 をはじめとする前がん病変関連マーカーの発現を示す細胞集団が認められ、GST-P 陽性前がん病変に対応する細胞状態を snRNA-seq 上で捉えられる可能性が示された (図 4)。

さらに、Seurat の AddModuleScore を用いて DDR 関連遺伝子群を統合した DDR module score を算出したところ、DEN 応答性細胞集団、特に DEN 応答性前駆細胞様集団および一部の DEN 応答性肝細胞集団において DDR 活性の上昇傾向が認められた (図 5)。

また、Gstp1 を前がん病変関連細胞集団の指標、増殖関連遺伝子群を細胞増殖活性の指標、DDR 関連遺伝子群を DNA 損傷応答の指標として予備的に評価した。その結果、DEN 応答性前駆細胞様集団では、GST-P 陽性前がん病変に関連する分子プロファイルに加え、増殖関連および DDR 関連スコアが相対的に高い傾向を示した。

D. 考察

本研究では、既存の遺伝毒性肝発がん物質投与試験由来のラット肝組織を用い、DDR 関連タンパク質の免疫組織化学的解析を行った。その結果、 γ -H2AX 陽性細胞は高用量群で認められたものの、陽性率は低く、低用量域における DDR 反応を定量的に捉えるには感度が十分でない可能性が示された。

今回検討した DDR 関連分子の多くは、これまでの mRNA 発現解析により遺伝毒性肝発がん性の予測に有用な候補として同定さ

れたものである。したがって、mRNA レベルでは発がん関連応答を高感度に反映する可能性がある一方で、タンパク質レベルでの発現量、抗体の特異性、細胞内局在、陽性細胞の頻度、FFPE 標本における抗原性保持などの要因により、免疫組織化学的検出では十分なシグナルが得られない可能性が考えられた。一方、 γ -H2AX 陽性細胞が高用量群に局限して散発的に認められたことは、発がん初期における DDR 反応が肝臓全体に均一に生じるのではなく、特定の少数細胞集団に局在して生じる可能性を示唆している。このことは、既知の DDR 関連タンパク質の免疫組織化学的解析のみでは、発がん初期の DDR 反応を定量的に捉えることが困難であることを示しており、細胞集団を分解して解析可能な snRNA-seq 解析を実施する根拠となった。

DEN 誘発ラット肝発がんモデルの 12 週時点の病理学的解析では、GST-P 陽性細胞巢が DEN 用量依存的に形成され、10 ppm で前がん病変形成の立ち上がりが確認された。また、50 ppm 群では肝実質の大部分が GST-P 陽性を示したことから、前がん病変に関連する細胞状態を効率よく捕捉し、DDR 応答細胞集団を探索するための解析条件として有用であると考えられる。

12 週時点サンプルを対象とした snRNA-seq 解析では、対照群と DEN 投与群の間で UMAP 上のクラスター分布に明らかな差異が認められ、DEN 投与に関連する複数の細胞集団が同定された。特に、Gstp1 をはじめとする前がん病変関連マーカーを発現する細胞集団が認められたことから、GST-P 陽性前がん病変に対応する細胞状態を単一核レベルで捉えられる可能性が示された。ま

た、DDR 関連遺伝子群を統合した module score 解析により、DEN 応答性細胞集団において DDR 活性の上昇傾向が認められたことから、snRNA-seq 解析は、発がん初期の DDR 応答細胞集団および発がん性予測に有用な新規 DDR 関連遺伝子候補を同定するための有効な手法であると考えられた。

さらに、DEN 投与に関連する特徴的な細胞集団のうち、GST-P 陽性前がん病変に対応すると考えられる前駆細胞様集団では、細胞増殖および DDR 関連応答の活性化傾向が認められた。このことは、DEN 誘発肝発がん早期における DDR 反応が、前がん病変形成に関わる特定の細胞集団に局在して生じる可能性を支持するものと考えられる。

今後、低用量、中用量および高用量の各群を比較することで、発がん性指標と DDR 関連遺伝子発現の用量反応性を統合的に評価できると期待される。また、12 週の前がん病変形成期サンプルと 20 週の腫瘍形成期サンプルを統合解析することにより、前がん病変から腫瘍形成に至る過程で維持または増強される DDR 関連細胞集団および遺伝子群を同定し、発がん性の定量評価に資する新規 DDR マーカー候補として検証する予定である。

さらに、本研究で得られた DEN 誘発ラット肝発がんモデルの肝組織、肝腫瘍および分子解析データは、研究班全体における DDR 法等の適用検証にも活用可能である。必要に応じて各分担研究班に材料を提供するとともに、各分担研究班で開発された新規 DDR 関連分子について、本モデルを用いた有用性検証を行うことで、研究班全体の新規発がん性定量評価手法の確立に貢献できると考えられる。

E. 結論

snRNA-seqを用いた細胞集団別解析は、発がん初期のDDR応答細胞集団の同定に有効であり、発がん性予測に資する新規DDR関連遺伝子候補の探索にも有用である可能性が示された。今後、12週および20週サンプルの統合解析と、研究班内で開発されるDDR関連分子の検証を通じて、定量的発がん性評価に資するDDRマーカー候補の確立を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Maeda-Tateishi, T, Nagata, Y, Imanishi, Y, Hirakawa, T, Tan, SS, Emoto, M, Gi, M. Evaluation of tumor clonality with chemical carcinogenesis in a mouse model of visualized X chromosome inactivation. *J Toxicol Pathol*. 2026; 39(1): 31-38.
2. Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Ogawa K, Gi M, Naiki-Ito A, Abdallah S, Tsuda H. Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment. *J Appl Toxicol*. 2026; 46(4): 1232-1245.
3. Vachiraarunwong A, Fujioka M, Alexander DB, Suzuki S, Guo R, Qiu G, Kawamura Y, Shibano K, Noura I, Praseatsook K, Akane H, Takasu S, Tsuda H, Ogawa K, Wanibuchi H, Gi M. Developing a novel in vitro toxicity assay for predicting inhalation toxicity in rats. *Toxicol Lett*. 2026; 415: 111803.
4. Gi M, Suzuki S, Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander WT, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Noura I, Kakehashi A, Xie XL, Tsuruoka S, Hirose A, Naiki-Ito A, Tsuda H, Wanibuchi H. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways. *Nanomaterials* (Basel). 2025; 15(23).
5. Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, Takase H, Taquahashi Y, Hojo M, Maeno A, Fukamachi K, Gi M, Hirose A, Tsuruoka S, Takahashi S, Tsuda H, Naiki-Ito A. Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs. *Nanomaterials* (Basel). 2025; 15(18).
6. Guo R, Gi M, Kiyono T, Vachiraarunwong A, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Praseatsook K, Kawamura Y, Kakehashi A, Noura I, Xie X, Wanibuchi H. Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in

- Toxicity Assessment of Arsenicals. *Toxics*. 2025; 13(10).
7. Turner MC, Godderis L, Guenel P, Hopf N, Quintanilla-Vega B, Soares-Lima SC, Chaiklieng S, Da Silva J, Fustinoni S, Gi M, Heck JE, Huaux F, Johanson G, Kirkeleit J, Kirsanov K, Richiardi L, Teixeira JP, Terron A, Topinka J, White MC, Benbrahim-Tallaa L, Facchin C, Kunzmann A, Madia F, Pasqual E, Wedekind R, Deng X, Suonio E, Viegas S, Barry A, Dolatkhan R, Dongoran RA, Gonzalez-Gil EM, Onyije FM, Mattock H, de Conti A, Schubauer-Berigan MK. Carcinogenicity of automotive gasoline and some oxygenated gasoline additives. *Lancet Oncol*. 2025; 26 (5): 548-549.
8. Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38(1): 59-67.
9. Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Taya S, Setthaya P, Sato K, Wanibuchi H, Wongpoomchai R, Dejkriengkraikul P, Gi M, Yodkeree S. Anticancer and Antioxidant Effects of Bioactive Peptides from Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*). *Nutrients*. 2025; 17(4).
10. Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Sato K, Dissook S, Wanibuchi H, Taya S, Wongpoomchai R, Dejkriengkraikul P, Gi M, Yodkeree S. Chemopreventive Effects of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae Protein Hydrolysates in a Rat Model of Early-Stage Colorectal Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2025; 26(13).
11. Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38(2): 147-154.
12. Nakano M, Gi M, Toyooka T, Suzuki S, Wanibuchi H, Takebayashi T. Occupational health topics series on the effects of chemicals: epidemiological and toxicological risk assessments of ortho-toluidine for bladder cancer. *J Occup Health*. 2025; 67(1).
13. Kakehashi A, Suzuki S, Nishidoi Y, Hagihara A, Ikenaga H, Shiota M, Qiu G, Noura I, Kuwae Y, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Gi M, Kawada N, Wanibuchi H. The Impact of Peroxiredoxin 3 on Molecular Testing, Diagnosis, and Prognosis in Human Pancreatic Ductal

Adenocarcinoma. *Cancers* (Basel). 2025; 17(13).

14. Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38(2): 161-165.

G.2 学会発表

1. Arpamas Vachiraarunwong, 魏民, 藤岡正喜, 鈴木周五, 邱桂鈺, 郭潤傑, 野浦郁恵, 梯アンナ, Kwanchanok Praseatsook, 鰐淵英機. ラットの急性吸入毒性を予測する新規 *in vitro* 毒性試験系の開発. 第 52 回日本毒性学会学術年会, 沖縄 (2025. 7)
2. Arpamas Vachiraarunwong, Kwanchanok Praseatsook, Rapiwan Wongpoomchai, Shugo Suzuki, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi, Supachai Yodkeree, Min Gi. Chemopreventive Potential of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae. がん予防学術大会 2025, 名古屋 (2025. 9)
3. 郭潤傑, Arpamas Vachiraarunwong, 鈴木周五, 藤岡正喜, Guiyu Qiu, 河村百合菜, 梯アンナ, 鰐淵英機, 魏民. DMH 投与ラットにおける大腸発がん初期の遺伝子発現変動. 第 84 回日本癌学会学術総会, 石川 (2025. 9)
4. Arpamas Vachiraarunwong, Shugo

Suzuki, Masaki Fujioka, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Kawamura Yurina, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Structure-Dependent Hepatotoxicity and Carcinogenic Potential of PFASs in Immortalized Human Liver Cells. 第 84 回日本癌学会学術総会, 石川 (2025. 9)

5. 邱桂鈺, 魏民, 鈴木周五, 藤岡正喜, 梯アンナ, ワシラアルンウオン アルパマス, 野浦郁恵, 郭潤傑, 鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露によるラット海馬に及ぼす影響. メタルバイオサイエンス研究会 2025, 東京 (2025. 9)
6. 鈴木周五, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 鰐淵英機. 動物モデルを用いた職業性膀胱がんの研究について. 第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 大阪 (2025. 10)
7. 藤岡正喜, 鈴木周五, 魏民, Vachiraarunwong Arpamas, 野浦郁恵, 邱桂鈺, 河村百合菜, 大石裕司, 山口貴嗣, 鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸の経胎盤ばく露による次世代雄性マウスにおける肝発がん機序の検討. 第 30 回ヒ素シンポジウム, 大阪 (2025. 12)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

別添 4

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 DDR 関連タンパク質の免疫組織化学的解析に用いた遺伝毒性肝発がん物質投与ラット肝組織

被験物質	ラット	投与期間 (投与経路)	用量
DEN	雄性 F344	16 週 (飲水)	0, 0.0001, 0.001, 0.1, 1, 10 ppm
DEN	雄性 BigBlue	16 週 (飲水)	0, 0.0001, 0.001, 0.1, 1 ppm
IQ	雄性 F344	16 週 (混餌)	0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ppm
IQ	雄性 <i>gpt delta</i>	4 週 (混餌)	0, 0.1, 1, 10, 100 ppm
MeIQx	雄性 F344	16 週 (混餌)	0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ppm
MeIQx	雄性 BigBlue	16 週 (混餌)	0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ppm

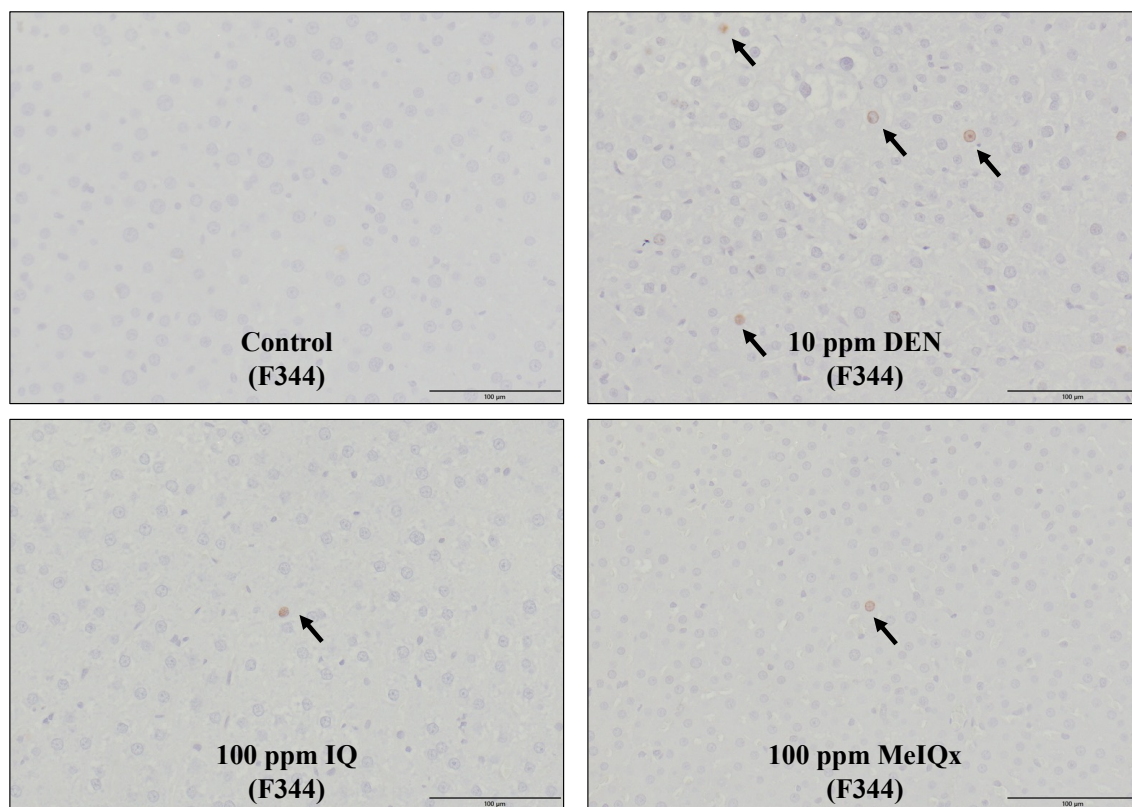


図 1 遺伝毒性肝発がん物質投与ラット肝臓における γ -H2AX 発現

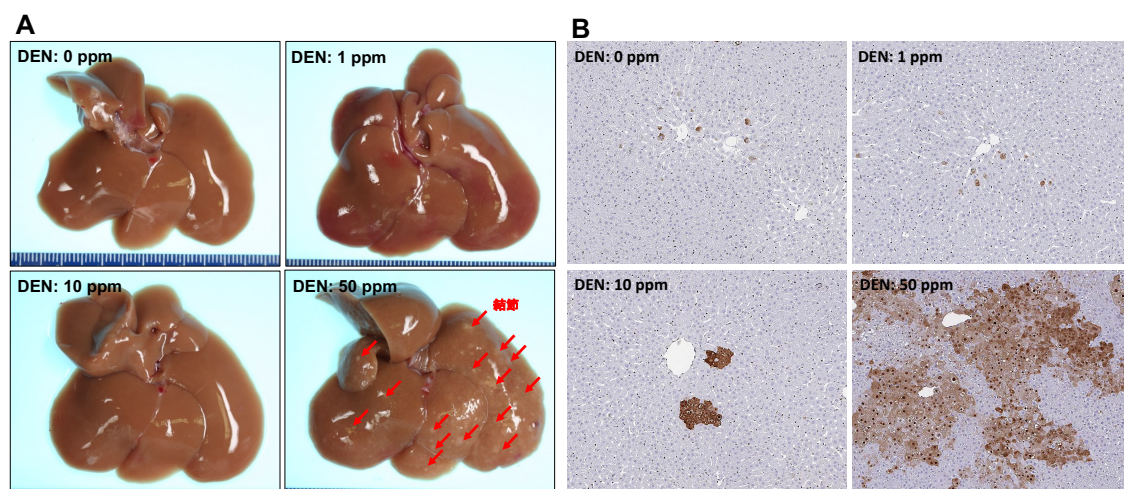


図2 DEN 投与 12 週時点におけるラット肝臓の肉眼像および GST-P 陽性細胞巣

A : DEN 投与 12 週時点の肝臓肉眼像。 B : GST-P 免疫染色像。

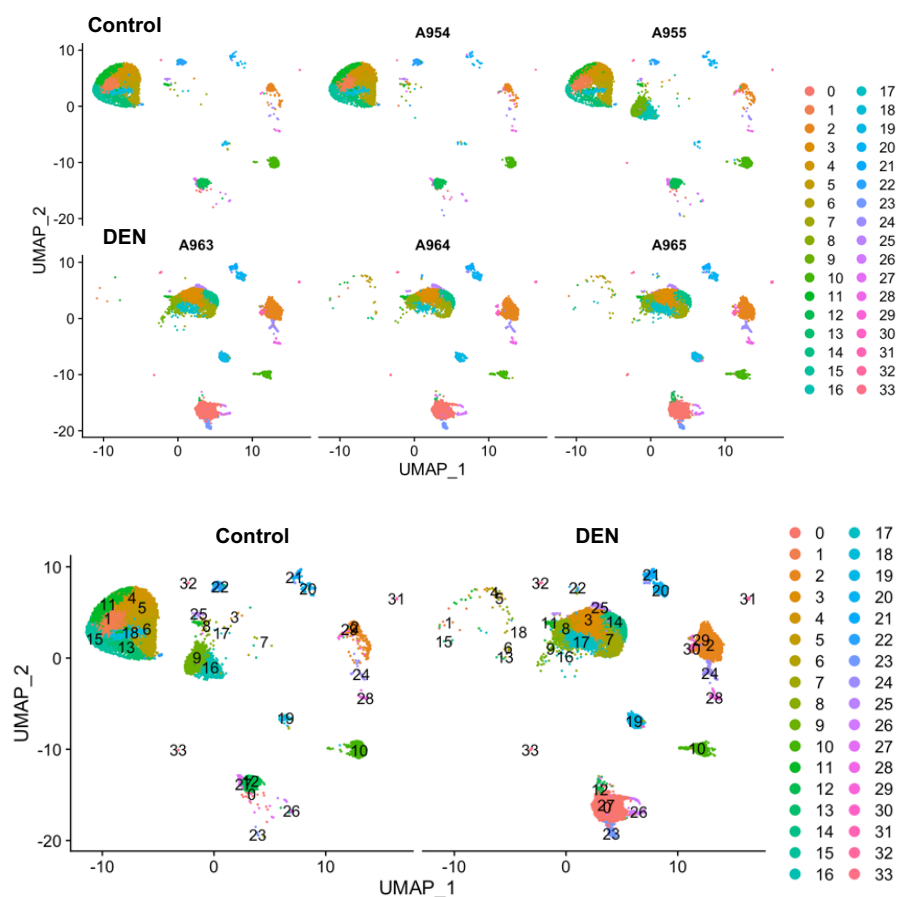


図3 DEN 誘発ラット肝発がんモデルにおける snRNA-seq 解析 : UMAP による DEN 投与関連 クラスターの抽出

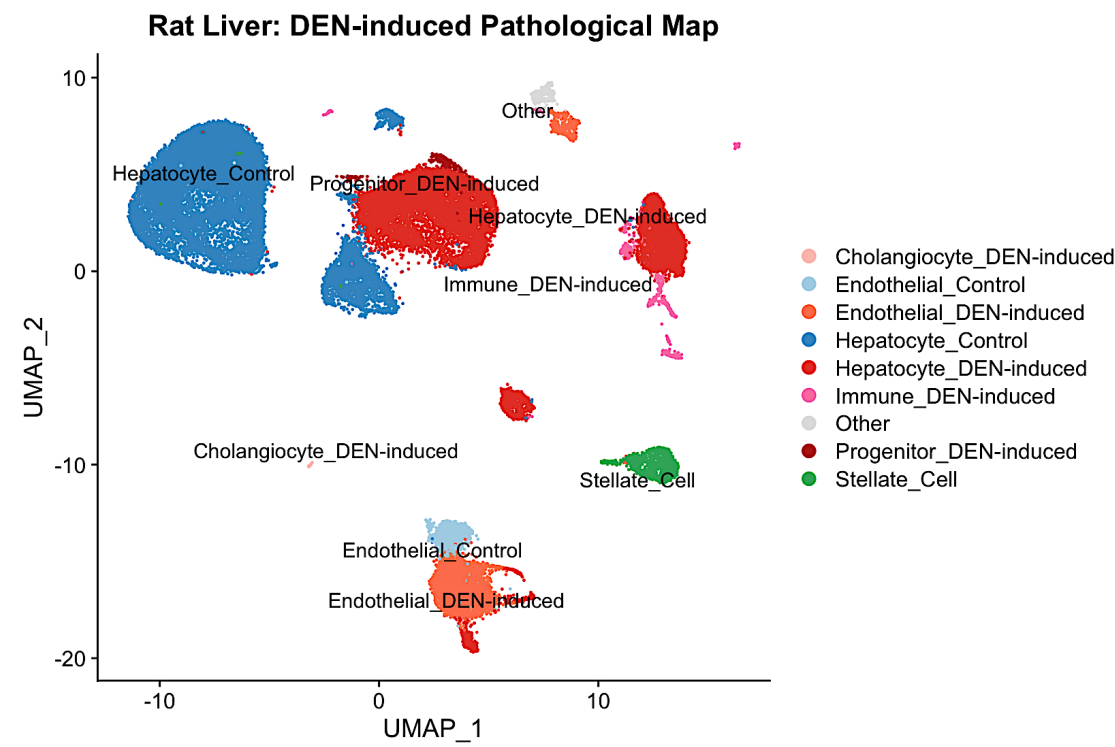


図 4 snRNA-seq 解析による DEN 応答性細胞集団の同定

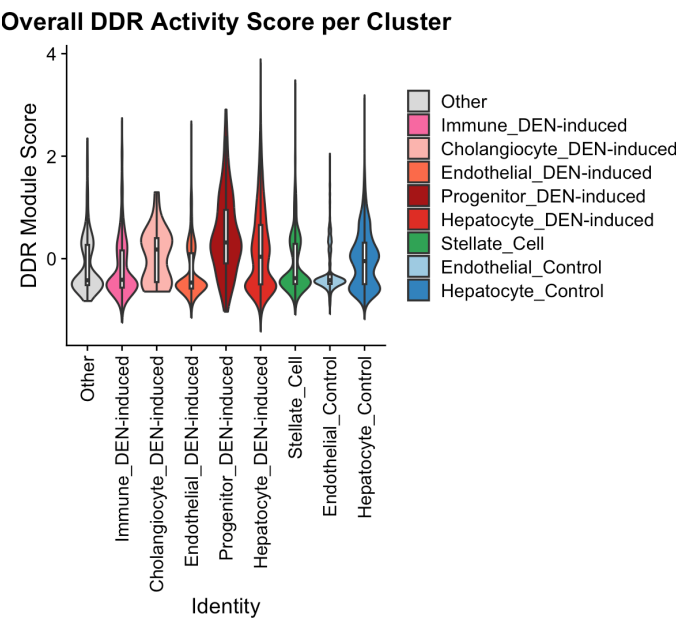


図 5 DEN 応答性細胞集団における DDR module score 解析

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
Morozumi R, Shimizu N, Amimoto T, Yamamoto J, Tsuda M.	A chemical labeling method for selective conjugation to DNA 3'-phosphoglycolate termini.	Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.			2026(Online ahead of print)
Yauk CL, Lynch AM, Dobrovolsky VN, Schuler M, Smith-Roe SL, Fitzgerald D, Higgins J, Honarvar N, Le Curieux F, Matsumura S, Minocherhomji S, Recio L, Salk JJ, Sugiyama KI, Suzuki T, Wills JW, Marchetti F	Application of error-corrected sequencing technologies for in vivo regulatory mutagenicity assessment	Regul Toxicol Pharmacol	164	1059	2026
Mitsumoto T, Ishihii Y, Takimoto N, Takasu S, Namiki M, Toyoda T, Ogawa K	Evaluation of 2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramide by a comprehensive toxicity study using gpt delta rats	Toxicol Appl Pharmacol	507	117686	2026
Maeda-Tateishi T, Nagata Y, Imanishi Y, Hirakawa T, Tanaka SS, Emoto M, Gi M	Evaluation of tumor clonality with chemical carcinogenesis in a mouse model of visualized X chromosome inactivation	J Toxicol Pathol			2026

Vachiraarunwong A, Fujioka M, Alexander DB, Suzuki S, Guo R, Qiu G, Kawamura Y, Shibano K, Noura I, Praseatsook K, Akane H, Takasu S, Tsuda H, Ogawa K, Waniuchi H, Gi M	Developing a novel in vitro toxicity assay for predicting inhalation toxicity in rats	Toxicol Lett	415	111803	2026
Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Ogawa K, Gi M, Naiki-Ito A, Abdallah S, Tsuda H	Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment	J Appl Toxicol			2026
Inoue K, Hirabayashi Y, Azuma A	Detailed hazard assessment of ethylbenzene to establish an indoor air quality guideline in Japan	Environ Health Prev Med	30	34	2025
Matsumoto M, Natsume M, Iso T, Umamo T, Murata Y, Masumura K, Horibata K, Sugiyama KI	Increased mutagenicity in the liver of Muon Mouse females following oral treatment with commercial-grade toluene diisocyanate	Genes Environ	47	12	2025
Hotani T, Goto M, Otsuki Y, Matsuda S, Wada N, Shinohara M, Matsuda T, Yokoi M, Sugawara K, Ohsaki Y, Sakai W	Dynamics of Fanconi anemia protein D2 in association with nuclear lipid droplet formation	J Cell Sci	138(21)	jcs264430	2025

Takimoto N, Ishihara Y, Mitsumoto T, Takasu S, Namiki M, Toyoda T, Shibutani M, Ogawa K	Involvement of nuclear atrophy of binucleated hepatocytes in the large micronucleus formation induced by rat hepatocarcinogen acetamide	Toxicol Appl Pharmacol	496	117243	2025
鈴木孝昌	Error-corrected next generation sequencing (ecNGS) の現状	毒性質問箱	27号	50-55	2025
Gi M, Suzuki S, Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander WT, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Noura I, Kakehashi A, Xie XL, Tsuruoka S, Hirose A, Naiki-Ito A, Tsuda H, Wanibuchi H	Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways	Nanomaterials (Basel)	15(23)		2025
Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, Takahase H, Taquahashi Y, Hojo M, Maeno A, Fukumachi K, Gi M, Hirose A, Tsuruoka S, Takahashi S, Tsuda H, Naiki-Ito A	Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs	Nanomaterials (Basel)	15(18)		2025
Guo R, Gi M, Kiyono T, Vachiraarunwong A, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Prasertsook K, Kawamura Y, Kakehashi A, Noura I, Xie X, Wanibuchi H	Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in Toxicity Assessment of Arsenicals	Toxics	13(10)		2025

Turner MC, Golderis L, Guenet P, Hopf N, Quintanilla-Vega B, Soares-Lima SC, Chaiklieng S, Da Silva J, Fustinoni S, Gi M, Heck JE, Huauaux F, Johanson G, Kirkeleit J, Kirsanov K, Richiardi L, Teixeira JP, Terro n A, Topinka J, White MC, Benbrahim-Tallaa L, Facchin C, Kunzmann A, Madia F, Pasqual E, Wedekind R, Deng X, Suonio E, Viegas S, Barry A, Dolatk hah R, Dongora n RA, Gonzalez -Gil EM, Onyije FM, Mattock H, de Conti A, Schubauer-Berig an MK	Carcinogenicity of automotive gasoline and some oxygenated gasoline additives	Lancet Oncol	26(5)	548-549	2025
Suzuki S, Gilm, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachira arunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H	Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice	J Toxicol Pa	38(1)	59-67	2025
Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Taya S, Setthaya P, Sato K, Wanibuchi H, Wongpoomchaisai R, Dejkriengkraikul P, Gilm, Yodkeree S	Anticancer and Antioxidant Effects of Bioactive Peptides from Black Soldier Fly Larvae (Hermetia illucens)	Nutrients	17(4)		2025

Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Sato K, Ditsook S, Wanibuchi H, Taya S, Wongpoomchai R, Dejkriengkraikul P, Gi M, Yodkeeree S	Chemopreventive Effects of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae Protein Hydrolysates in a Rat Model of Early-Stage Colorectal Carcinogenesis	Int J Mol Sci	26(13)		2025
Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H	Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes	J Toxicol Pathol	38(2)	147-154	2025
Nakano M, Gi M, Toyooka T, Suzuki S, Wanibuchi H, Takebayashi T	Occupational health topics series on the effects of chemicals: epidemiological and toxicological risk assessments of ortho-toluidine for bladder cancer	J Occup Health	67(1)		2025
Kakehashi A, Suzuki S, Nishidai Y, Hagihara A, Ikenaga H, Shiota M, Qiu G, Noura I, Kuwae Y, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Gi M, Kawada N, Wanibuchi H	The Impact of Peroxiredoxin 3 on Molecular Testing, Diagnosis, and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	Cancers (Basel)	17(13)		2025
Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H	Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats	J Toxicol Pathol	38(2)	161-165	2025

Honda H, Suzuki T, Kitajima M, Kondo NI, Miyata K, Utsunomiya S, Yamada M	The new era shaped by environmental genome monitoring - symposium of the Japanese environmental mutagen and genome society (JEMS), 2024.	Genes Environ	47	6	2025
Matsumura S, Hosoi S, Hirose T, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Kawade A, Hakura A, Kikuchi D, Asakura S, Koyama N, Okada Y, Chikura S, Kimoto T, Masumura K, Suzuki T, Sugiyama KI.	Whole genome mutagenicity evaluation using Hawk-Seq™ demonstrates high inter-laboratory reproducibility and concordance with the transgenic rodent gene mutation assay.	Genes Environ	47	13	2025

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性予測評価部・室長
(氏名・フリガナ) 井上 薫・イノウエ カオル

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) ゲノム安全科学部・室長
(氏名・フリガナ) 堀端 克良・ホリバタ カツヨシ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和8年 5月 13日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人 京都大学

所属研究機関長 職 名 大学院 工学研究科長

氏 名 鈴木 基史

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院工学研究科・准教授
(氏名・フリガナ) 松田 俊・マツダ シュン

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

令和8年3月30日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) ゲノム安全科学部・室長
(氏名・フリガナ) 安井 学・ヤスイ マナブ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター 病理部・室長
(氏名・フリガナ) 石井 雄二・イシイ ユウジ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職 名 所長
氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) ゲノム安全科学部・部長
(氏名・フリガナ) 杉山圭一・スギヤマケイイチ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職 名 所長
氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) ゲノム安全科学部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 鈴木 孝昌・スズキ タカヨシ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) ゲノム安全科学部・任期付研究員
(氏名・フリガナ) 諸角 涼介・モロズミ リョウスケ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人大阪
所属研究機関長 職 名 理事長
氏 名 福島 伸一

次の職員の令和7年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大阪公立大学大学院医学研究科・ 准教授
(氏名・フリガナ) 魏 民 (ギ ミン)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☒ 有 ☐ 無	☒	大阪公立大学	☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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