

令和5年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

研究課題名：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

研究代表者： 杉山圭一

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）において、遺伝毒性試験の情報などから閾値なしと判断された優先評価化学物質のリスク評価を滞りなく進めるために、多数の労力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。それを踏まえ、「既存のデータを活用した定量的発がん性評価手法の開発と活用法の提案に関する研究」については、化審法での人健康に関する有害性評価における*in silico*評価手法の新たな活用場面を提案するため、スクリーニング評価において独自のリードアクロス（RA）を活用することを目指し、ケーススタディを実施した。「遺伝毒性発がんリスク評価のための*in vivo*遺伝毒性の定量的解析」については、トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験（TGR試験）の用量反応データからベンチマークドーズ（BMD）法により変異原性のpoint of departure（POD）を算出し、発がん性POD（TD₅₀、BMDL₁₀）と比較した結果、概ね正の相関を示した。異なる量的指標を比較するための包括的な係数を用いた方法を検討した。「プロテオミクスデータを利用した*in vitro*遺伝毒性試験の精緻化に関する研究」については、未処理細胞実験とマンニトール処理細胞実験によるプロテオミクスとエンリッチメント解析の結果に、DNA修復関連のGOが観察されないことは、昨年度のH₂O₂処理細胞から得られた結果が、非常に信憑性が高いことを示すと考えられた。プロテオミクスデータの特性上の問題点、および検索データベースの構成など、いくつかの問題点はあるものの、現時点で、DIA法を使用したトキシコプロテオミクスデータとエンリッチメント解析は、*in vitro*遺伝毒性試験に有用であることが示唆された。「固定化標本を利用した定量定性的な新規*in vitro* / *in vivo*遺伝毒性評価手法の開発」については、抗APE1抗体を用いたChIP法および定量的PCRによりアルキル化DNA損傷応答反応を検出できることを明らかにし、それに基づいてアルキル化剤を投与した動物固定標本を作成した。「NGSを用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性研究」については、次世代シーケンサー（NGS）を用いた発がん性予測手法の開発を目標として、NGSを用いた変異原性評価手法について基盤情報の収集を行った。その結果、NGSを用いた手法は、過去に行われた遺伝子改変げっ歯類（TGR）試験の結果と高い相関を示した。また、得られたデータから変異スペクトル解析を行ったところ、過去のTGR試験においてラットに投与された薬剤特有の変異スペクトルを得ることができた。これらの結果は、NGSによる変異原性評価手法が既存手法を代替する手法として有用であることを示した。「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」では、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確立を目的として、病理組織学的手法による小核を有する細胞の定量解析法の構築と、染色体不安定性による化学発がん機序の解明を実施した。抗γ-H2AX抗体を用いた免疫組織化学染色による小核検出法を確立し、肝臓小核誘発物質3剤を用いて28日間反復投与毒性試験への適用性を確認した。染色体不安定性による化学発がん機序として、acetamide（AA）誘発肝腫瘍における原因遺伝子の探索を行い、*Myc*に加え、*Mdm2*のコピー数増加がAAの肝腫瘍誘発過程における重要なイベントであることを明らかにした。

研究分担者

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

増村 健一

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

別添 3

安全性予測評価部・部長
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
変異遺伝部・室長
堀端 克良
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
変異遺伝部・室長
津田 雅貴
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
変異遺伝部・室長
伊澤 和輝
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
変異遺伝部・任期付研究員
鈴木 孝昌
国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部・主任研究官
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

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、評価の優先順位付けを行う評価Ⅰ段階から、発がん性情報を得られた物質については遺伝毒性の定性的評価結果に基づき判断した閾値の有無に応じて、発がん性の有害性評価値を導出することされる。しかし、遺伝毒性試験の情報などから閾値なしと判断され発がん性の懸念があるにもかかわらず、発がん性の定量的評価に資する発がん性試験結果の情報が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。評価Ⅰの段階で、毒性学的懸念の閾値（TTC）値を適用するなど暫定的な方法で優先順位付けを行う事ができても、評価Ⅱ段階で必要とされる精緻な発がん性定量的評価ができ

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、多数の動物や時間・費用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。

一方、近年開発が進むAmes試験結果を*in silico*により予測するAmes/QSARは、医薬品中DNA反応性（変異原性）不純物の評価及び管理のガイドラインICH-M7でその活用が医薬品の不純物管理手法として既に実用化されているが、化審法では、新規化学物質の審査及び一般化学物質のスクリーニング評価における遺伝毒性評価の参考データとしての取り扱いに留まる。

以上を踏まえて、分担課題「既存のデータを活用した定量的発がん性評価手法の開発と活用法の提案に関する研究」では、前年度に実施した国内外での*in silico*評価手法の活用状況に関する調査結果を踏まえ、令和5年度以降は、スクリーニング評価においてリードアクロス（RA）を活用促進することを目指し、独自のRAによる評価を試みるためのケーススタディを実施することとした。また、RAの妥当性を示すためには、構造の類似性だけでなく、毒性プロファイルの共通性、体内動態に関する共通性、物理化学的性質の共通性などについて、可能な限り情報を収集し、その根拠を示す必要がある。そのため、実施するケーススタディに基づき、化審法のためのスクリーニング評価における、独自のRAによる評価のあり方（類似物質候補の検索方法、評価結果の示し方、類似性やRA/グルーピングの妥当性に関する説明方法等）の検討を行うことを目的に実施することとした。

分担課題「遺伝毒性発がんリスク評価のための*in vivo*遺伝毒性の定量的解析」では、遺伝毒性を有する化学物質の発がん性の定量的評価に応用可能な遺伝毒性評価法の開発を目指した。特に、*in vivo*遺伝毒性試験の用量反応データから遺伝毒性POD（Point of Departure）を算出し、発がん性PODとの相関

性から、発がん性評価に資する遺伝毒性の量的評価指標について検討することを目的とした。

発がん性を有するアルキル化剤や活性酸素種が、発がん初期において、ゲノムDNA上で一塩基変異を誘発させるDNA付加体を形成し、塩基除去修復等のDNA損傷機構を促進させる遺伝毒性スキームが存在することを明らかにしており、それを踏まえて、分担課題「プロテオミクスデータを利用した*in vitro*遺伝毒性試験の精緻化に関する研究」では、昨年度の実験で、未処理細胞に対するプロテオミクスとエンリッチメント解析の結果、コントロールの未処理細胞であるにも関わらず、まれにDNA修復等のジンオントロジー (GO) が観察されることがあった。よって、基礎的な背景データを得るために、①培地血清の濃度を変えて培養した未処理実験、および②変異原性を示さない陰性対照物質マンニトールの処理実験を行った。

分担課題「固定化標本を利用した定量定性的な新規*in vitro* / *in vivo*遺伝毒性評価手法の開発」については、*in vitro*遺伝毒性試験結果から発がん性を定量的に予測するための基盤的な情報を得るため、遺伝毒性評価および発がん性評価に用いる研究材料・試験系等の統合を見据えた定量定性的な新規*in vitro* / *in vivo*遺伝毒性評価手法を開発することを目指し、その第一段階として、クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) をベースとした遺伝毒性活性検出法の最適化を行った。

分担課題「NGSを用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性研究」では、*in vivo*の変異原性試験と発がん性試験の結果について、NGSを基盤とした技術によって解析し、新たな発がん性予測手法の開発を目指す。これまで*in vivo*の変異原性試験について、NGSを用いた*in vivo*変異原性検出手法がマウスにより行われているが、発がん性試験はラットで行われることが多いことから、ラット組織サンプルにおけるNGSを用いた*in vivo*変異原性検出手法の基盤技術開

発、および基盤的情報取得を行った。

近年、小核がchromothripsisと呼ばれる劇的な遺伝子変異を引き起こすことが明らかとなった。さらに、肝臓小核試験と肝発がん性には高い相関があることから、化学発がんの根底にも染色体不安定性が寄与すると考えられている。そこで分担課題「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、発がん性定量評価を見据えた新たな遺伝毒性評価技術として、染色体不安定性を指標とする発がん性定量的評価法を検討した。また、染色体不安定性が発がん性の指標になりうる根拠として、染色体不安定性による化学発がん機序の解明を目的に、肝臓小核誘発物質であるacetamide (AA) の肝腫瘍誘発過程におけるchromothripsisの関与について検討した。

B. 研究方法

「既存のデータを活用した定量的発がん性評価手法の開発と活用法の提案に関する研究」については、RAのケーススタディの対象物質として、過去のスクリーニング評価において評価保留となった2物質 (ジイソブチル=ヘキサジオアート (CAS RN: 141-04-8) 及びノナン-1-オール (CAS RN: 143-08-8)) を選定した。各対象物質について、類似物質候補の検索を行い、候補物質の絞り込みの条件を各々検討した。最終的に得られた類似物質候補について、一般毒性試験、生殖発生毒性試験、発がん性試験に関する情報を収集した。ジイソブチル=ヘキサジオアートについては、類似物質候補の有害性情報のほかに、それらの体内動態や物化性状についても調査し、共通性の有無等を検討した。得られた有害性情報等については、物質毎に表形式に整理した。

「遺伝毒性発がんリスク評価のための*in vivo*遺伝毒性の定量的解析」については、既知の遺伝毒性発がん物質の遺伝毒性試験に基づいた定量的評価指標の導出と発がん性評価への応用可能性を検討した。トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験 (TGR

試験) と発がん性の量的相関性を検討するため、ベンチマークドーズ (BMD) 法を用いて変異原性PODを算出し、発がん性PODと比較した。過去に実施した肝発がん物質のTGR試験データに加えて、文献情報から発がん標的臓器が異なる物質のデータを追加して相関性への影響を検討した。

「プロテオミクスデータを利用した*in vitro*遺伝毒性試験の精緻化に関する研究」については、将来的に、遺伝毒性試験に組み込むことを見据えて、プロテオミクスや濃縮分析等の方法は、比較的誰でも簡単にできるプロトコルを採用した。①未処理細胞実験では、5%あるいは10%馬血清を含む二種類の培地を使って、培養開始(0時間)から1.5と3時間後の細胞をサンプリングした。②マンニトール処理細胞実験は、OECDガイドラインのTG487: 哺乳類細胞を用いた*in vitro*小核試験のプロトコルに従って実施した。事前にマンニトールの3時間処理後の用量設定試験(非代謝活性化条件下)を行い、24時間後に細胞毒性が観察されなかったため、1822 µg/mL (10 mM) を設定用量とした。マンニトール処理中は、マンニトール処理群と未処理群を用意して、培養開始(0時間)から1822 µg/mLマンニトール連続処理群と未処理群の細胞を、0.5、4、24時間後にサンプリングした。各細胞ペレット(8 x 10⁵ cells)を液体窒素で急冷、保存した。質量分析装置はUltimate 3000を備えたESI-四重極/FT型タンデム質量分析装置Q-Exactive (Thermo Fisher)、DIA解析ソフトはScaffold DIA (Matrix Science)を使用した。濃縮分析については、フリーで利用可能なMetascapeウェブサイト (<https://metascape.org/>) を使用し、検索データベースはKEGG (京都大学) を使用した。

「固定化標本を利用した定量定性的な新規 *in vitro/in vivo* 遺伝毒性評価手法の開発」については、*in vitro* 遺伝毒性試験結果から発がん性を定量的に予測するための基盤的な情報を得るため、遺伝毒性評価および発がん性評価に用いる研究材料・試験系等の統

合を見据えた定量定性的な新規 *in vitro / in vivo* 遺伝毒性評価手法を開発することを目指す。そのため、今年度は引き続き組織標本への適用性を見据えたクロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) をベースとした遺伝毒性活性検出法の最適化を行った。化学物質による遺伝毒性応答反応をChIP法で検出することができるかどうかを明らかにするため、293細胞に*N*-ethyl *N*-nitrosorena (ENU)を処理し、ChIPおよびリボソームDNA (ribosomal DNA; rDNA) unitを標的とした定量的PCRにより、DNA損傷誘導時におけるAPE1のrDNA上での位置的相対量変化を解析した。また、rDNA上での解析結果を踏まえ、ハウスキーピング遺伝子であるGPADH遺伝子上でのAPE1の相対量変化を解析した。加えて、これらの結果から化学物質による遺伝毒性応答反応をChIP法で検出することができることが明らかになったため、動物固定化標本への適用に着手した。ChIP法を用いた*in vivo* 遺伝毒性応答反応検出については前例がないため、動物固定化標本の作成については、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た。C57BL/6NCrSlcマウス(8週齢、雄、各群3匹)に、PBS、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時間後に末梢血および肝臓を採取した。末梢血は*in vivo* 末梢血小核試験に用いるためメタノール固定を行った。肝臓については、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組織標本を作成した。また、「ホルマリン固定下の肝小核試験法」を参照に、一部の肝臓組織を使用して組織の可溶化およびChIPへ向けたDNA切断条件の検討を開始した。「ホルマリン固定下の肝小核試験法」で実施されている12 MのKOH終夜処理により細胞をばらし、超音波処理によりDNAを

切断した後、それぞれを精製してアガロスゲル電気泳動法でDNAの切断状態を調査した。また一部のサンプルでChIPを実施し、固定標本へのChIPの適用性の予備検討を実施した。

「NGSを用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性研究」については、過去に実施された遺伝子改変げっ歯類 (TGR) 試験で用いられたラットのサンプルを入手し、本研究に使用した。ジエチルニトロソアミン (DEN) 投与群 (n=3)、非投与群 (n=3) の各サンプルから、illumina社NextSeq2000によってゲノム配列情報を取得した。得られたゲノムデータについて、既存の変異原性検出手法 (PECC-Seq) を応用し、DENによって誘導された変異が検出可能であるかを変異頻度の変化、および変異スペクトルから検証した。

「染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法」として、病理標本を用いた小核化細胞の検出を目標に、肝臓に小核を誘発する肝発がん物質AA、quinoline及びN-nitrosopropylamine (NNP) を投与したラット肝臓を用いて、小核化細胞の検出法を検討する。本年度は、昨年度実施したマイクロアレイ解析で共通して発現増加した34の遺伝子について、それらがコードするタンパクの免疫組織化学染色を実施し、小核化細胞の指標としての有用性を検討した。また、抗γ-H2AX抗体を用いた免疫組織化学染色による小核化細胞の検出についても検討した。「染色体不安定性による化学発がんメカニズムの解明」として、染色体不安定性による発がんが疑われるアセトアミド誘発のラット肝腫瘍でコピー数増加が確認された遺伝子のうち、Mdm2がコードするMDM2タンパクの免疫組織化学染色法を実施し、がん遺伝子のコピー数増加と発がんとの関係を検索した。

(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

「既存のデータを活用した定量的発がん性評価手法の開発と活用法の提案に関する研究」については、2物質を対象に実施しているケーススタディにおいて、独自に類似物質候補を検索し、最終的に選抜した類似物質候補について、有害性情報等の収集・整理と各物質の物理化学的性状、代謝物の調査を行った。類似物質候補に関する各毒性項目の有害性情報の精査を進めており、現時点では、類似物質候補の妥当性等については判断できていない。

「遺伝毒性発がんリスク評価のための*in vivo*遺伝毒性の定量的解析」については、肝発がん物質において、変異原性POD (BMDL₅₀) と発がん性POD (TD₅₀) は概ね正の相関性を示した。異なる発がん試験から得られたTD₅₀の値には数10倍～数100倍のばらつきがあり、複数のTD₅₀の平均値と範囲を発がん性PODとして変異原性BMDL₅₀と比較した。腎発がん物質のアリストロキア酸のデータを加えるとばらつきが大きくなった。文献情報から遺伝毒性発がん物質12物質のデータを比較した結果、変異原性BMDL₅₀を係数100で除すると発がん性BMDL₁₀を下回る傾向が見られた。

「プロテオミクスデータを利用した*in vitro*遺伝毒性試験の精緻化に関する研究」では、ヒトTK6細胞に対して、未処理培養実験、および変異原性を示さない陰性対照物質 (マンニトール) の処理実験によるプロテオミクスを実施した。その結果、10%馬血清を用いたとき、通常の細胞増殖等による酸化ストレスのジンオントロジー (GO) が観

察されたが、DNA修復関連GOは無かった。また、マンニトール処理実験でも顕著なDNA修復GOは観察されなかった。

「固定化標本を利用した定量定性的な新規*in vitro* / *in vivo*遺伝毒性評価手法の開発」について、293細胞にENUによるDNA損傷を誘導後、抗APE1抗体を用いたChIPおよびrDNA unitを標的とした定量的PCRによりAPE1のrDNA上での位置的相対量変化を解析した。その結果、DNA損傷を誘導しない場合では、APE1はrDNA unit全体、特にrDNAの上流に多くに局在した。ENU処理後は、解析したrDNA上のほぼ全ての領域でENUの濃度依存的なAPE1のrDNAへの結合量の増大を検出した。またENU処理によるAPE1のrDNA上での位置的な局在変化は見られなかった。GAPDH遺伝子を標的とした解析では、ENU処理によりAPE1のGAPDH遺伝子上への結合量の増大を検出したが、ENUの濃度依存性は見られなかった。動物固定化標本の作成については全ての投与、採材および固定が完了した。また、一部の固定化肝臓組織を使用した組織可溶化およびChIPへ向けたDNA切断条件の検討では、「ホルマリン固定下の肝小核試験法」での条件では、超音波処理の有無に関わらず全ての分画でDNAが100~500 bpに切断された。これらの一部でChIPを実施したが、共沈するDNA量は非常に少なく、定量的PCRでもほとんど検出できなかった。

「NGSを用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性研究」について、解析の結果、DEN非投与群においては平均して 1.0×10^{-6} の頻度、DEN投与群においては平均して 6.6×10^{-6} の頻度で突然変異が検出された。各群の変異頻度間には有意に差がある ($p < 0.05$) ことが統計検定により示された。また既存の変異原性試験である*gpt*アッセイの結果と $R^2=0.89$ と高い相関を示した。

次に各変異について変異スペクトル解析を行った。その結果、DEN処理群においてはT>Aの変異が非投与群に比べ約43倍誘発されており最も増加していた。またT>Aの変異

においても非投与群・投与群間で有意な差があることが統計検定により示された ($p < 0.05$)。

「染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法」として、マイクロアレイから抽出した遺伝子のうち、*Srms*、*Srd5a1*、*Lhx8*及び*Oat*がコードするタンパクについて免疫組織化学染色法による検出を行ったが、小核化細胞に特異的な染色性は認められなかった。一方、抗 γ -H2AX抗体を用いた免疫組織化学染色では、小核そのものが陽性を呈し、本法により小核化細胞の検出が可能であった。さらに、その割合は肝臓小核試験の結果と高い相関を示した。

「染色体不安定性による化学発がんメカニズムの解明」では、アセトアミド誘発肝腫瘍において、*Mdm2*がコードするMDM2タンパクの免疫組織化学染色を実施した結果、肝細胞腺腫の67.9%、肝細胞癌の88.2%の細胞質において陽性所見を認めた。さらに、肝細胞腺腫の32.1%、肝細胞癌の78.4%は、*c-Myc*及びMDM2の両方に陽性を示すことを明らかにした。

D. 考察

「既存のデータを活用した定量的発がん性評価手法の開発と活用法の提案に関する研究」については、実施している2物質のケーススタディにおいて、現時点では独自に検索した類似物質候補の妥当性等については判断できていないが、類似物質候補に関する各毒性項目の有害性情報の精査を進めており、物化性状や代謝物の有害性も併せて確認し、類似物質候補とした物質が、各評価対象物質と化学的・毒性学的に類似と言えるかを検証し、妥当な類似物質であると説明可能と言える場合は、類似物質の有害性情報から類推した各評価対象物質のスクリーニング評価結果案を作成する。また、本ケーススタディの過程で、評価結果の示し方、類似性やRead across/グルーピングによる評価の妥当性に関する説明提示方法等についても検討しており、独自のRAによるス

クリーニング評価のあり方を提案する。

「遺伝毒性発がんリスク評価のための*in vivo*遺伝毒性の定量的解析」については、肝発がん物質の標的組織において、変異原性PODと発がん性PODに概ね正の相関がみられた。一方、標的臓器が異なる発がん物質のデータを追加するとばらつきが大きくなる可能性が示唆された。相関性の比較において、試験データの選択に加えて、発がん物質ごとの標的組織の違いや発がんメカニズムの違い等がばらつきの要因になると考えられた。文献情報から遺伝毒性発がん物質12物質の変異原性POD (BMDL₅₀) と発がん性POD (BMDL₁₀) を比較した結果、変異原性BMDL₅₀ を係数100で除すると発がん性BMDL₁₀を下回る傾向が見られた。限られたデータに基づく結果ではあるが、TGR試験から算出した変異原性PODを発がん性評価の量的指標に利用できる可能性が示唆された。

「プロテオミクスデータを利用した*in vitro*遺伝毒性試験の精緻化に関する研究」について、昨年度実施したH₂O₂処理したTK6細胞を用いるプロテオミクスも、先と同じ方法で、H₂O₂処理群と未処理群のそれぞれをScaffold DIA上でSSPsを抽出した。それらをエンリッチメント解析した結果、0.5時間処理群では、「アポトーシス」、「BERおよびミスマッチ修復 (MMR) を含むDNA複製」、および「相同組換え」が、エンリッチメント解析のトップ20位内にリストアップされた。つまり、本年度に実施された未処理実験とマンニトール処理実験によるプロテオミクスとエンリッチメント解析の結果に、DNA修復関連のGOが観察されないことは、昨年度のH₂O₂処理細胞から得られた結果が、非常に信憑性が高いことを示すと考えられた。以上のことから、プロテオミクスおよびエンリッチメント解析は、既知のH₂O₂遺伝毒性スキームどおりに、DNA修復等の生命活動を検出できることが分かった。

「固定化標本を利用した定量定性的な新規*in vitro* / *in vivo*遺伝毒性評価手法の開発」

について、ENUの濃度依存的なAPE1のrDNAへの結合量の増大が見られた。ENUが誘導するDNA損傷はDNAのアルキル化であり、これらのアルキル化DNA損傷は通常は塩基除去修復機構で修復されることが知られている。APE1は塩基除去修復機構において、DNAグリコシラーゼが損傷した塩基を除去するときに作成されるAP部位のホスホジエステル主鎖にニックを作成することが知られていることから、今回、ENUの濃度依存的なAPE1のrDNAへの結合量の増大を検出したことは、本手法により定量定性的なアルキル化DNA損傷応答反応を検出できることを意味する。また、GAPDH遺伝子を標的とした解析では、ENU処理によりAPE1のGAPDH遺伝子上への結合量の増大を検出したが、ENUの濃度依存性は見られなかった。rDNAでの位置的な解析では一部の領域ではENUの濃度依存性が確認できていない。今回の結果はGAPDH遺伝子上の特定の1箇所のみを標的としたものであるため、ENUの濃度依存性をより詳しく知るためには、GAPDH遺伝子上の他の部位でも再度検証する必要がある。また、肝臓組織可溶化の条件検討では超音波処理の有無に関わらず全ての分画でDNAが100~500 bpに切断され、ChIPでも共沈するDNA量は非常に少なく、定量的PCRでもほとんど検出しなかった。その原因として、12 MのKOHを終夜処理するという条件は非常に強いアルカリ処理であり、DNA自体がChIP法または定量的PCR解析には適さない状態になっていると考えられる。「ホルマリン固定下の肝小核試験法」においてもこの条件ではアルカリ処理が強すぎるという議論もあり (personal communication)、アルカリ条件を弱めるなど、ChIPでの最適な処理条件を検討する必要がある。

「NGSを用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性研究」について、本研究で利用したNGSを基盤とする変異原性評価手法による解析から、DEN処理群において有意に突然変異頻度が増加していたことから、

薬剤処理によって誘発された突然変異をラットサンプルにおいても検出可能であることが示された。また既存の評価手法である *gpt* アッセイの結果と高い相関を示したことから、*gpt* 遺伝子のようなレポーター遺伝子をゲノム上に持たない通常のラット試料を用いても変異原性を評価できることが示唆された。

変異スペクトル解析を行った結果から、DEN特有の変異であるT>Aの変異が非投与群に比べて大幅に増加していたことから薬剤によって誘発される特有の突然変異についても検出可能であることが示された。

「染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法」では、AA、quinoline及びNNPを投与したラット肝臓で発現増加した遺伝子から、小核化細胞の指標となるタンパクの発現は確認できなかった。このことは、肝臓における小核化細胞の割合が低いことに起因すると考えられた。一方、小核は抗 γ -H2AX抗体を用いた免疫組織化学染色において陽性を呈し、28日間反復投与試験において、その割合が肝臓小核試験の結果と高い相関を示したことから、本法が病理標本を用いた小核試験に有用であることを確認した。また、「染色体不安定性による化学発がんメカニズムの解明」として、c-Mycに比べMDM2の発現は多くの変異肝細胞巣およびHCAで確認されたことから、MDM2発現によるp53抑制がAAによる腫瘍の発生過程の重要な役割を担っていると考えられた。

E. 結論

「既存のデータを活用した定量的発がん性評価手法の開発と活用法の提案に関する研究」については、引き続きケーススタディを実施し、妥当な類似物質であると説明可能と言える場合は、類似物質の有害性情報から類推した各評価対象物質のスクリーニング評価結果案を作成する。また、独自のRAによるスクリーニング評価のあり方を提案する。

「遺伝毒性発がんリスク評価のための*in vivo*遺伝毒性の定量的解析」については、TGR試験と発がん性試験の量的比較を試みた。用量反応データからBMD法により変異原性PODを算出し、発がん性PODと比較した。両者には概ね正の相関がみられた。標的臓器が異なるデータが加わるとばらつきが大きくなる傾向がみられた。変異原性POD (BMDL₅₀) を係数10~100で除すると発がん性POD (TD₅₀, BMDL₁₀) を下回る傾向がみられた。TGR試験から算出した変異原性PODを発がん性評価の量的指標に利用できる可能性が示唆された。

「プロテオミクスデータを利用した*in vitro*遺伝毒性試験の精緻化に関する研究」については、現段階において、まだ実験データが十分ではないが、H₂O₂処理細胞では、容易にDNA修復や酸化的ストレスGOが観察され、主たる生命活動を示す中央クラスターGOとノード接続されたが、一方、未処理細胞や非変異原性物質を処理した細胞は、そうでなかった(引き続き実験が必要)。つまり、プロテオミクスデータの特性上の問題点、および検索データベースの構成など、いくつかの問題点はあるものの、現時点で、DIA法を使用したトキシコプロテオミクスデータとエンリッチメント解析は、*in vitro*遺伝毒性試験に有用であることが示唆された。

「固定化標本を利用した定量定性的な新規*in vitro* / *in vivo*遺伝毒性評価手法の開発」では、塩基除去修復機構で重要な役割を果たすAPE1を認識するモノクローナル抗体を用いたChIP法および定量的PCRにより、定量定性的なアルキル化DNA損傷応答反応を検出できることを明らかにした。また、固定化組織を用いる研究では、通常は可溶化等が困難なホルマリン固定化サンプルでも、「ホルマリン固定下の肝小核試験法」の方法を適用することで可溶化できることが明らかになった。ただし、この方法をそのまま適用するとアルカリ条件が強すぎるため、ChIP法に適用するには更なる条件検討が必要である。これらの条件が整い次第、固定化

肝臓での定量定性的なアルキル化DNA損傷応答反応を解析し、また、末梢血小核試験との相関性を明らかにする必要がある。

「NGSを用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性研究」ではNGSを基盤とした*in vivo*変異原性検出手法の基盤技術開発、および基盤的情報取得のため、既存のTGR試験サンプル(ラット)の解析を行い、本研究成果は、*Genes and Environment*誌のFeatured articleとして掲載された。

NGSを基盤とした*in vivo*変異原性検出手法は既存の*in vivo*変異原性検出手法を代替する手法として有用であることが示されたが、1試験由来の試料のみのデータである、容量反応性についてのデータが不足しているなどの課題が多い。このため、今後もNGSを基盤とした*in vivo*変異原性検出手法を利用して過去の試験サンプルの解析を行い、基盤的情報の取得を継続する。

「染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法」として、抗 γ -H2AX抗体を用いた免疫組織化学染色により病理標本でMNHEPを検出する病理組織学的肝臓小核試験(HLMN assay)を確立した。本法を用いることで、28日間反復投与試験で得られた組織切片において肝臓のMNHEPの割合を評価できることを確認した。また、「染色体不安定性による化学発がんメカニズムの解明」として、AAによる腫瘍の誘発および悪性化には、*Mdm2*および*Myc*のコピー数増加が寄与することを明かにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Kawashima A, Inoue K, Ushida K, Kai K, Suzuki H, Yoshida-Yamashita LS, Hirose A, Masumura K: Derivation of human health hazard assessment values of 1,2-dichloroethane under the Japan Chemical Substances Control Law. *Fundamental Toxicol Sci.* 10: 91-103, 2023
2. Murata Y, Natsume M, Takako I, Shigeta Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K, Hirose A, Matsumoto M: In vivo mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver and lung. *Genes and Environment.* 45, 12, 2023
3. Murata Y, Suzuki K, Shigeta Y, Iso T, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama KI, Hirose A, Masumura K, Matsumoto M: In vivo mutagenicity assessment of orally treated tert-butyl hydroperoxide in the liver and glandular stomach of MutaMouse. *Genes and Environment.* 45, 29, 2023
4. Beevers C, Uno Y, Meurer K, Hamada S, Hashimoto K, Kirkland D, LeBaron MJ, Le Curieux F, Le Hegarat L, Martus HJ, Masumura K, Ohyama W, Roberts DJ, Vasquez M, Whitwell J, Witt KL: *In Vivo* Genotoxicity Testing Strategies: Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Environ Mol Mutagen.* Early View: doi: 10.1002/em.22578., 2023
5. You X, Cao Y, Suzuki T, Shao J, Zhu B, Masumura K, Xi J, Liu W, Zhang X, Luan Y: Genome-wide direct quantification of *in vivo* mutagenesis using high-accuracy paired-end and complementary consensus sequencing. *Nucleic Acids Res.* 51:e109., 2023
6. Takeda-Nishikawa K, Rajaguru P, Miyazato N, Suzuki T What samples are suitable for monitoring antimicrobial-resistant genes? Using NGS technology, a comparison between eDNA and mrDNA analysis from environmental water. *Front. Microbiol.* 14, 954783, 2023
7. Yamada M, Suzuki T, Kohara A, Honma M Carcinogenic risk of food additive AF-2 banned in Japan: a case study on reassessment of genotoxicity. *Genes*

- Environ.*, 45, 33, 2023
8. Hirose S, Ohya K, Yoshinari T, Ohnishi T, Mizukami K, Suzuki T, Takinami K, Suzuki T, Lee K, Iyoda S, Akeda Y, Yahata Y, Tsuchihashi Y, Sunagawa T, Hara-Kudo Y. Atypical diarrhoeagenic *Escherichia coli* in milk related to a large foodborne outbreak. *Epidemiol Infect.*, 151, e150, 2023
 9. Shimizu N, Hamada Y, Morozumi R, Yamamoto J, Iwai S, Sugiyama KI, Ide H, Tsuda M: Repair of topoisomerase 1-induced DNA damage by tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) is dependent on its magnesium binding. *J Biol Chem.* 299, 104988, 2023
 10. Izawa K, Tsuda M, Suzuki T, Honma M, Sugiyama KI: Detection of in vivo mutagenicity in rat liver samples using error-corrected sequencing techniques. *Genes Environ.* 45, 30, 2023
 11. Ishii Y., Namiki M., Takasu S., Nakamura K., Takimoto N., Mitsumoto T., Ogawa K. Lack of genotoxic mechanisms in isoeugenol-induced hepatocellular tumorigenesis in male mice. *Jpn. J. Food Chem. Safety.* 30 (1), 9-22, 2023
 12. Ishii Y., Liang Shi, Takasu S., Ogawa K., Umemura T. A 13-week comprehensive toxicity study with adductome analysis demonstrates the toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of the natural flavoring agent elemicin, *Food Chem. Toxicol.* 179, 113965, 2023
 13. Mitsumoto T., Ishii Y., Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Nohmi T., Umemura T., Ogawa K. Site-specific genotoxicity of rubiadin: localization and histopathological changes in the kidneys of rats. *Arch. Toxicol.* 97 (12), 3273-3283, 2023
 14. Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Kijima A., Matsushita K., Masumura K., Nohmi T., Umemura T. Possible contribution of 8-hydroxydeoxyguanosine to gene mutations in the kidney DNA of gpt delta rats following potassium bromate treatment. *Mutat. Res.* 894, 2024
 15. Takimoto N., Ishii Y., Mitsumoto T., Takasu S., Namiki M., Shibutani M., Ogawa K. Formation of hepatocyte cytoplasmic inclusions and their contribution to methylcarbamate-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats. *Toxicol. Sci.* 198 (1), 40-49, 2024
 16. Iso T, Suzuki K, Murata Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama KI, Hirose A, Masumura K, Matsumoto M: Lack of in vivo mutagenicity of carbendazim in the liver and glandular stomach of MutaMice. *Genes and Environment.* 46, 7, 2023
 17. Beal MA, Chen G, Dearfield KL, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Long AS, Lovell D, Parsons BL, Pfuhrer SP, Wills J, Zeller A, Johnson G, White PA: Interpretation of In Vitro Concentration-Response Data for Risk Assessment and Regulatory Decision-making: Report from 2022 IWGT Quantitative Analysis Expert Working Group Meeting. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* Version of Record online: 01 February 2024
 18. Parsons BL, Beal MA, Dearfield KL, Douglas GR, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Kenyon M, Long AS, Lovell D, Lynch AM, Myers MB, Pfuhrer S, Vespa A, Zeller A, Johnson G, White PA: Severity of Effect Considerations Regarding the Use of Mutation as a Toxicological Endpoint for Risk Assessment: A Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Environmental and Molecular Mutagenesis.* in press, 2024

1. Beal BA, Chen G, Dearfield KL, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, K. Horibata K, Long AS, Lovell D, Parsons BL, Pfuhler S, Wills J, Zeller A, Johnson G, White PA. The interpretation of in vitro dose-response data for risk assessment and regulatory decision-making. 51st European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EEMGS) & 27th Spanish Environmental Mutagenesis and Genomics Society (SEMA) meeting (2023.5.15. Málaga, Spain)
2. 石井雄二. 食品香料の安全性に関する研究, 日本食品化学学会 第 29 回総会・学術大会 講演 2023 年 6 月, 富山
3. 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 高須伸二, 並木萌香, 能美健彦, 小川久美. 2-Isopropyl-N-2,3-trimethyl buthylamide の包括的毒性評価, 日本食品化学学会 第 29 回総会・学術大会 2023 年 6 月, 富山
4. 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 相馬明玲, 高須伸二, 渋谷 淳, 小川久美子. 齧歯類に見られる acetamide の肝発がん性の種差に関する研究, 第 50 回日本毒性学会学術年会 2023 年 6 月, 神奈川
5. 石井雄二. 化学発がんにおける chromothripsis の関与, 第 50 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム 2023 年 6 月, 神奈川
6. 堀端克良. Quantitative analysis of genotoxicity data. 哺乳動物試験研究会 第 82 回定例会 (2023.6.9. 東京)
7. 松村奨士, 大坪裕紀, 細井紗弥佳, 廣瀬貴子, 池田直弘, 齋藤和智, 伊藤勇一, 鈴木孝昌, 増村健一, 杉山圭一: 遺伝毒性評価を見据えた ECS に関する検討. 第 50 回日本毒性学会学術年会(2023.06)
8. 増村健一, 本間正充: 肝発がん物質を用いた *in vivo* 変異原性と発がん性の定量的解析. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.06)
9. 津田雅貴, 清水直登, 笹沼博之, 武田俊一, 井出博. DNA にトラップされたタンパク質が引き起こすゲノム毒性とその関連疾患. 第 50 回日本毒性学会学術年会, 神奈川県 (2023.06)
10. 細井紗弥佳, 廣瀬貴子, 大坪裕紀, 松村奨士, 齋藤和智, 池田直弘, 伊藤勇一, 小山直己, 川出明弘, 羽倉昌志, 柿内太, 朝倉省二, 岡田祐樹, 木本崇文, 千蔵さつき, 南結香子, 鈴木孝昌, 増村健一, 杉山圭一: Error-corrected sequencing を用いた遺伝毒性評価法の有用性検証 (JEMS/MMS 共同研究). 第 50 回日本毒性学会学術年会(2023.06)
11. 磯貴子, 村田康允, 広瀬望, 馬野高昭, 重田善之, 長谷川彩由香, 堀端克良, 六鹿元雄, 杉山圭一, 広瀬明彦, 増村健一, 松本真理子. Evaluation of the in vivo mutagenicity of azodicarbonamide. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19. 横浜)
12. 村田康允, 重田義之, 磯貴子, 馬野高昭, 広瀬望, 長谷川彩由香, 堀端克良, 杉山圭一, 広瀬明彦, 増村健一, 松本真理子. In vivo mutagenicity assessment of orally treated tert-butyl hydroperoxide in Muta Mouse liver and glandular stomach. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19. 横浜)
13. 甲斐薫, 牛田和夫, 山下ルシア幸子, 川島明, 鈴木洋, 井上薫, 増村健一: α -(ノニルフェニル)- ω -ヒドロキシポリ(オキシエチレン)の人健康影響に係るスクリーニング評価. 第 50 回日本毒性学会学術年会(2023.06)
14. 山下ルシア幸子, 牛田和夫, 甲斐薫, 川島明, 広瀬明彦, 増村健一, 井上薫: 化審法のリスク評価 (一次) 評価 I における発がん性定量的評価: 代表 TD₅₀ 適用に代わる評価値導出方法の検討. 第 50 回日本毒性学会学術年会(2023.06)
15. 山田隆志, 大畑秀雄, 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充, 瀬川勝智, 齋藤嘉朗,

- 相崎健一, 北嶋聡, 広瀬明彦, 増村健二: 行政における化学物質リスク評価を支援する AI を用いた安全性予測プラットフォームの開発. 第 50 回日本毒性学会学術年会(2023.06)
16. 伊澤和輝, 津田雅貴, 鈴木孝昌, 本間正充, 杉山圭一. ラット肝臓試料を用いた in vivo 変異原性評価における ECS 手法の応用可能性. 第 9 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム, 東京都 (2023.09)
 17. Murata Y, Matsumoto M, Iso T, Shigeta Y, Hasegawa S, Umano T, Hirose N, Horibata K, Sugiyama KI, Inoue K, Hirose A, Masumura K. In vivo mutagenicity assessment and derivation of reference dose of styrene. EUROTOX 2023 (2023.9.10. Ljubljana, Slovenia)
 18. Suzuki T, You X, Izawa K, Tsuda M, Honma M, Luan Y, Sugiyama K. Remaining errors in error-corrected NGS (ecNGS) methods learned from the development of the Paired-End and Complementary Consensus Sequencing (PECC-Seq). 54th Annual Meeting of the Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS) (2023.9)
 19. Horibata K, Sugiyama KI. Detection of genotoxic reactions through direct analysis of DNA damage responses on chromatin fraction. 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023.9.21. 横浜)
 20. 津田雅貴, 井出博. DNA にトラップされたトポイソメラーゼ 1 の除去機構. 第 82 回日本癌学会学術集会, 神奈川県 (2023.09)
 21. 赤根 弘敏, 豊田 武士, 石井 雄二, 高須 伸二, 小川 久美子. ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的解析による抗甲状腺物質の効率的な検出, 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 8 月, 神奈川
 22. 石井 雄二, 高須 伸二, 小川 久美子. アセトアミド誘発ラット肝腫瘍におけるクロモスリプシス様染色体再構成の関与, 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 8 月, 神奈川
 23. 増村健一: ニトロソアミン変異原性評価の国際動向-CPCA と EAT-. QSAR ワークショップ 2023 (日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会サテライトミーティング) (2023.10)
 24. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一. クロマチン分画での DNA 損傷応答解析による遺伝毒性反応の検出. 日本放射線影響学会第 66 回大会 (2023.11.7. 東京)
 25. 津田雅貴, 濱田優作, 清水直登. 相同組換え中間体解消における動的变化を可視化する技術の開発. 日本放射線影響学会第 66 回大会, 東京都 (2023.11)
 26. 増村健一, 安東朋子, 石井雄二, 杉山圭一: *gpt delta* マウスにアクリルアミドが誘発する生殖系列突然変異と曝露時の精子形成ステージの影響. 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会(2023.11)
 27. 大坪裕紀, 細井紗弥佳, 廣瀬貴子, 松村奨士, 齋藤和智, 池田直弘, 宮澤正明, 小山直己, 川出明弘, 羽倉昌志, 柿内太, 朝倉省二, 岡田祐樹, 木本崇文, 千蔵さつき, 南結香子, 滑川淳一, 鈴木孝昌, 増村健一, 杉山圭一: Error-corrected sequencing を用いた遺伝毒性評価法の有用性検証 (JEMS/MMS 共同研究). 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会 (2023.11)
 28. 東航平, 鈴木孝昌, 山田雅巳. ナノポアシーケンサー MinION による菌の同定と変異検出のワークフロー. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会, 福岡県 (2023.11)
 29. 鈴木孝昌, 降旗千恵. トキシコゲノミクスバイオマーカの現状と将来展望. 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会, 福岡県 (2023.11)

30. 安井学, 鶴飼明子, 澁谷眞也, 本間正充, 杉山圭一, 第II相薬物代謝酵素を機能させた補因子補充型 *in vitro* 小核試験系の構築, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会, 福岡市(2023.11.11)
31. 堀端克良. 遺伝毒性のプラクティカルな評価方法と適用性. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023.11.11. 福岡)
32. 寺越菜央, 高藤賢, 中谷一真, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 藤木亮次, 金田篤志, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, DNA 損傷を起因とした過剰なインターフェロン応答の分子経路の同定, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会, 福岡市 (2023.11.12)
33. 佐々木沙耶, 杉山圭一, 堀端克良. クロマチン分画上的 DNA 損傷応答解析によるアルキル化剤誘発遺伝毒性反応の検出. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023.11.12. 福岡)
34. グループピーター, 山田雅巳, 本間正充, 堀端克良, 杉山圭一. Construction of new Ames tester strain deficient in the AlkB demethylase. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023.11.12. 福岡)
35. 三浦康義, 松村一史, 福島俊朗, 杉山圭一, 堀端克良, 加藤雅之, 菅野拓也, 羽倉昌志. BMS 共同研究, 弱変異原性物質に対する感受性の比較 ; TA97, TA97a vs TA1537 及び WP2uvrA ϕ KM101 vs WP2uvrA. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023.11.12. 福岡)
36. 津田雅貴, 清水直登. 相同組換え中間体解消における動的変化を可視化する技術の開発. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会, 福岡県 (2023.11)
37. 伊澤和輝, 津田雅貴, 鈴木孝昌, 本間正充, 杉山圭一. ecNGS 手法を利用したラット肝臓試料における *in vivo* 変異原性解析. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会, 福岡県 (2023.11)
38. 石井 雄二, 瀧本 憲史, 田原 麻衣子, 河上 強志, 相馬 明玲, 高須 伸二, 小川 久美子. アセトアミドの大型小核誘発機序に関わる代謝物の検索, 第 52 回日本環境変異原ゲノム学会 2023 年 11 月, 福岡
39. 岩崎滉, 清水開, 上村慶高, 堀越保則, 孫継英, 安井学, 本間正充, 岡部篤史, 藤木亮次, 金田篤志, 田代聡, 佐々彰, 浦聖恵, ヒストンメチル化酵素 NSD2 は部位特異的 DNA 二本鎖切断の修復経路選択を制御する, 第 46 回日本分子生物学会年会, 神戸市 (2023.12.6)
40. 津田雅貴, 濱田優作, 清水直登. 相同組換え中間体解消における動的変化の可視化. 第 46 回日本分子生物学会年会, 兵庫県 (2023.12)
41. 石井雄二, 山上洋平, 田原麻衣子, 河上強志, 瀧本憲史, 笠松健吾, 相馬明玲, 高須伸二, 小川久美子. Acetamide のラット肝臓における代謝物と核の形態異常への関与, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
42. 笠松建吾, 石井雄二, 山上洋平, 高須伸二, 相馬明玲, 小澤俊介, 渋谷 淳, 小川久美子. 免疫組織化学染色による小核化肝細胞の検出, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
43. 高須伸二, 石井雄二, 相馬明玲, 松本真理子, 小川久美子. SD ラットを用いた decyltrimethoxysilane の 13 週間反復投与試験, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
44. 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 満元達也, 相馬明玲, 小川久美子. Acetamide の肝発がんに関与する肝細胞質内封入体の形成機序, 日本薬学会第 144 年会 2024 年 3 月, 神奈川
45. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一. Detection of genotoxic reactions by directly analyzing DNA damage responses on chromatin fraction. 日本薬学会第 144 年会 (2024.3.30. 横浜)

別添 3

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

該当なし

H-2. 実用新案登録

該当なし

H-3. その他