

令和6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 ゲノム安全科学部

**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）からベンチマークドーズ（BMD）法を用いて変異原性のpoint of departure（POD）を算出し、発がん性PODと比較した結果、概ね正の相関を示し、変異原性BMDL<sub>50</sub>（mg/kg/day）を係数100で除すると発がん性BMDL<sub>10</sub>を下回った。異なる量的指標を比較するためには包括的な係数を用いることが有用と考えられた。「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」については、明確ではないがシスプラチンに対するDNA修復関連の生命活動を観察することができた。しかしながら、使用された0.5および1.5 µg/mLシスプラチン用量は、TK6突然変異試験では明らかに陽性となる用量であり、プロテオミクスとエンリッチメント解析系において、この用量域でDNA修復関連の生命活動変化を十分に捉えるためには、さらなる感度向上の条件検討や適切なサンプリング時間の設定が重要であることが明らかとなった。「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」については、「拡大希釈および終夜脱架橋」による固定組織の可溶化とDNA切断条件を検討し、APE1を認識するモノクローナル抗体を用いたChIP法に適用した結果、*N*-enthyl *N*-nitrosorea投与マウス組織において、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。「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、NGSを基盤とした*in vivo*変異原性検出手法の基盤技術開発、および基盤の情報取得のため、既存のTGR試験サンプル（ラット）のNGS解析を行い、TGR試験結果とNGS解析結果が高い相関性を示すことを明らかにした。「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、病理組織学的手法による小核を有する肝細胞の定量解析法の構築として、抗γ-H2AX抗体を用いたHLMN assayと肝臓小核試を比較し、その結果に高い相関が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機序として、acetamide（AA）誘発肝腫瘍における染色体外環状DNAの形成を明らかにし、AAの肝発がんにおけるchromothripsisの関与を支持する結果を得た。さらに、新規試験法評価として、*gpt delta*ラットを用いたquinolineのレポーター遺伝子変異原性試験を実施し、その結果と凍結サンプルを提供した。

**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

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

ゲノム安全科学部・室長

堀端 克良

### 別添 3

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

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  
ゲノム安全科学部・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  
ゲノム安全科学部・主任研究官

鈴木 孝昌

国立医薬品食品衛生研究所  
ゲノム安全科学部・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、スクリーニング評価においてリードアクロス(RA, 類推)を活用促進することを目指し、2物質に関するRAによる評価のケーススタディを実施し、その結果を踏まえて、独自のRAによる評価のあり方・進め方を提案する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て、*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)の算出を行い、発がん性PODとの相関性から発がん性評価に資する変異原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、典型的な遺伝毒性物質であるシスプラチンを用いて、その用量依存的な遺伝毒性作用がTK6細胞内で観察されるかを調べるために、DIA(Data-Independent Acquisition)法によるプロテオミクスおよびエンリッチメント解析系を実施した。

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、肝臓小核試験と肝臓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、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=ヘキサシオアート（CAS RN: 141-04-8）及びノナン-1-オール（CAS RN: 143-08-8））をRAのケーススタディの対象物質として選定し、スクリーニング評価の最終目的である有害性クラス付与を類推でどのように行うべきかを検討した。また、ケーススタディの結果を踏まえ、スクリーニング評価におけるRAによる有害性クラス付与の進め方（案）を提案した。

「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、*in vivo*変異原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。肝臓がん物質のTGR試験データおよび発がん標的臓器が異なる物質のデータを用いて相関性を検討した。さらに、BMDの信頼区間を考慮した変異原性と発がん性の強さを比較することにより、順位付けやグループ分けが可能かどうかを検討した。

「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、0.5および1.5 µg/mLシスプラチン処理したTK6細胞を用いるプロテオミクス（消化物ペプチド1 µgを導入）において、シスプラチン処理群（0.5および4 hr）と未処理群（0.5および4 hr）のそれぞれを用意し、未処理群のそれらも同様の時間培養して、各細胞ペレット（ $8 \times 10^5$  cells）をサンプリングし、-80度で保管した。Scaffold DIA上で比較、統計的に有意に増減のあったタンパク質群を抽出した。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。エンリッチメント分析は、Metascapeウェブサイト（<https://metascape.org/>）を使用し、検

### 別添 3

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動物実験を実施し、そこから作成したホルマリン固定化肝臓標本を用いて、「ホルマリン固定下の肝小核試験法」を参照して組織の可溶化およびChIPへ向けたDNA切断条件の検討を実施した。また、別途、「拡大希釈および終夜脱架橋」による固定組織の可溶化とDNA切断条件を検討した。その結果、ChIP法への適用可能性が見出されたため、APE1を認識するモノクローナル抗体を用いたChIP法に適用した。ChIP法で得られたDNA画分を鋳型DNAとし、マウスrDNA unitを標的としたプライマーセット2種 (rDNA\_2およびrDNA\_4) およびハウスキーピング遺伝子である*Gapdh* 遺伝子を標的としたプライマーセット1種を用いた定量的PCR解析により、DNA損傷誘導時におけるAPE1のDNA上での相対量変化を解析することで、DNA上で直接的に生じているDNA損傷応答の定量・定性的検出を試みた。

「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、*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。

本研究期間においては、過去に実施された遺伝子改変げっ歯類 (TGR) 試験において用いられたラットのサンプル (用量反応性あり) を入手し、本研究に使用した。エレミシン投与群 (中用量 (100mg/kg bw/day) n=2, 高用量 (400mg/kg bw/day) n=2)、溶媒 (Corn oi) 投与群 (n=1) の各サンプルから、Illumina社シークエンサー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、エレミシン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、変異スペクトルおよび用量反応性から検証した。

「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、令和5年度に構築したg-H2AXの免疫組織化学染色により小核を検出するHLMN assayの有用性を検討した。本年度は、遺伝毒性肝発がん物質として*N*-nitrosopyrrolidine (NPYR)、非遺伝毒性肝発がん物質としてmethapyrilene (MP) 及びthioacetamide (TAA)、遺伝毒性非肝発がん物質としてpotassium bromate (KBrO<sub>3</sub>) をラットに28日間反復投与し、HLMN assayと肝臓小核試験肝臓で小核を有する肝細胞 (MNHEP) を検出し、その結果を比較した。「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acetamide (AA) 誘発のラット肝腫瘍で染色体の構造異形を検索し、がん遺伝子のコピー数増加との関連を検討した。さらに、新規試験法評価として、quinolineを*gpt delta*ラットに28日間反復投与後、肝臓のレポーター遺伝子変異原性試験を実施した。

(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。また、DNA組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組み換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

### 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（ジイソブチルヘキサジジオアート (CAS RN: 141-04-8)）及びノナン-1-オール (CAS RN: 143-08-8) を対象として実施したケーススタディを実施し、前者では、評価対象物質の代謝物、類似物質候補とその代謝物の有害性評価の結果付された有害性クラスから、後者では炭素鎖長の異なる類似物質候補の有害性評価の結果付された有害性クラスから、類推により各評価対象物質（場合により有害性クラス付与ができていなかった一部の類似物質候補）の有害性クラス（案）を付与することができた。また、これらのケーススタディの結果を踏まえ、「類似物質候補の代謝物に共通性が認められるケース」及び「炭素鎖長の異なる類似物質候補が得られるケース」に遭遇した場合のRAによる有害性クラス付与の進め方（案）について、具体的方法を提案した。

「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、文献情報に基づいて遺伝毒性発がん物質12物質の変異原性POD (BMDL<sub>50</sub>) と発がん性POD (BMDL<sub>10</sub>) を比較した結果、両者は概ね正の相関性を示した。変異原性BMDL<sub>50</sub>を係数100で除すると発がん性BMDL<sub>10</sub>を下回る傾向が見られた。12物質の変異原性の強さを比較するためにBMDの信頼区間 (BMDU-BMDLの範囲) を考慮して検討した結果、遺伝毒性が強いグループと弱いグ

ループに大別されたが、さらに細かいグループ分けはできなかった。一方、発がん性については、発がん性の強さは概ねBMDL<sub>10</sub>と相関していた。

「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、DIA法によるプロテオミクスとエンリッチメント解析系は、シスプラチンに対して、明確ではないがDNA修復関連の生命活動を観察することができた。本実験条件では用量依存的によりも、経時的に細胞をサンプリングするほうがDNA修復関連の生命活動を検出できる傾向があった。

「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、「ホルマリン固定下の肝小核試験法」を参照して実施した組織の可溶化条件ではChIPに不適であった。引き続き、「拡大希釈および終夜脱架橋」による固定組織の可溶化とDNA切断条件を検討した。その結果、ChIPに最適とされる500~100 bpの範囲内のDNA画分が得られた。この条件下でPBSまたは*N*-ethyl *N*-nitrosorene (ENU; 100 mg/kg体重/回) を投与したマウス由来のホルマリン固定化肝臓組織標本の一部を用いて組織可溶化とDNA切断を実施し、APE1を認識するモノクローナル抗体を用いたChIP法およびリアルタイムPCRにより、APE1タンパク質と共沈するDNA定量と相対比較を実施した。その結果、rDNA<sub>2</sub>およびrDNA<sub>4</sub>のプライマーセットを用いたDNA定量では、PBS<sub>101</sub>群と比較してENU<sub>101</sub>群およびENU<sub>102</sub>群では有意に多くの沈降DNA量が検出された。その一方で、*Gapdh*遺伝子を標的としたプライマーセットを用いたDNA定量では、PBS<sub>101</sub>群と比較して有意な差を示した群は見られなかった。

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、溶媒投与群においては $1.1 \times 10^{-7}$ の頻度、エレミシン中用量投与群においては平均して $1.9 \times 10^{-7}$ の頻度、エレミシン高用量投与群においては平均して $7.4 \times 10^{-7}$ の頻度で突然変異

が検出され用量反応性を示した。また既存の変異原性試験である*gpt*アッセイの結果と $R^2=0.93$ と高い相関を示した。

次に誘発された変異について変異スペクトル解析を行った。その結果、エレミン処理群においてはT>A, T>Cの変異について用量反応性のある変異頻度の増加が見られた。

「染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法」では、HLMN assayと小核試験において肝発がん物質であるNPYP、TAA及びMP群でMNHEPの増加が認められ、非肝発がん物質であるKBrO<sub>3</sub>群で変化は見られなかった。「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、オプティカルゲノムマッピング解析により、Myc遺伝子を含む環状DNAの形成が明らかとなった。また、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーションでは、AA誘発の肝腫瘍細胞において、7番染色体セントロメアの増加を伴わないMyc遺伝子の増幅が確認された。「新規試験法評価のためのレポーター遺伝子変異原性試験」では、quinoline投与群の肝臓においてG:C-C:G transitionの増加を特徴とする用量依存的な*gpt*変異体頻度の上昇を明らかにした。

#### 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、2物質のケーススタディの結果を踏まえ、「類似物質候補の代謝物に共通性が認められるケース」及び「炭素鎖長の異なる類似物質候補が得られるケース」に遭遇した場合のRAによる有害性クラス付与の進め方(案)について、以下の手順で進める具体的方法を提案することができた。

- ① 毒性プロファイルの把握、類似物質候補の検索、
- ② 類似物質候補の有害性、分子量、物理化学的性状、体内動態に関する情報の収集・整理、
- ③ 類似物質候補等の有害性評価、
- ④ 評価対象物質の類推による有害性クラス検討、
- ⑤ 有害性評価案の客観的評価(予審・本審)。ノナン - 1 - オールについては、既に本審まで終了していることから、類推

した有害性クラスについては妥当性が認められており、進め方は実用であったと考える。一方、ジイソブチル=ヘキサンジオアートについては、令和7年度中に前述⑤の進め方で予審・本審を実施する。

「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、投与経路や解析臓器が異なる遺伝毒性発がん物質12物質のTGR試験データを用いた検討において、変異原性POD (BMDL<sub>50</sub>)と発がん性POD (BMDL<sub>10</sub>)が概ね正の相関性を示すこと、変異原性POD (BMDL<sub>50</sub>)を係数100で除した値が発がん性POD (BMDL<sub>10</sub>)を下回ることが示唆された。このことは、包括的な係数を用いて発がん性の強さを予測できる可能性を示唆しているかもしれない。*In vivo*変異原性から発がん性の強さを予測しようとする場合、ある程度の不確実性を許容しつつ、異なるエンドポイントの量的指標を比較するための包括的な係数を用いた実際的な方法が有用と考えられる。その際、どのような条件で試験データを選択して評価に採用するかが重要である。BMDの信頼区間(BMDL-BMDUの範囲)を考慮した検討では、個々の物質の変異原性の強さを順位付けすることはできず、TGR試験から導出されたBMDの精度が十分ではない可能性が考えられた。より精度の高い定量的評価に適した試験設計を検討することも今後の課題と考える。

「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、プロテオミクスとエンリッチメント解析系の実験データはまだ不十分であるが、細胞内のタンパク質群の動きは予想以上に劇的に変化するため、本実験系は、一律のサンプリング時間を設けるのではなく、被験物質ごとに、DNA修復関連の生命活動を観察できるサンプリング時間を探索する必要があると考えられた。今後、より広範な化学物質を対象とした検証が必要と考える。

「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、ChIP法では免疫沈降に供するためのクロマチン画分の調整が極めて重要である。今回の結果から、「拡大希釈および終夜脱架橋」による固定組織の可溶化条件では免疫沈降に適用可能なサンプル調整が可能であることが明らかになった。また、この可溶化条件下でのChIPおよび定量的DNA解析結果から、rDNAを標的とした場合はアルキル化DNA損傷応答反応を検出できることを明らかにした。その一方で、Gapdh遺伝子を標的とした場合は有意な差は検出されなかった。この原因として、rDNAは1細胞中にマルチコピー存在する一方で、Gapdh遺伝子は2コピーしか存在せず、検出感度が低くなっていることが考えられる。また、昨年度の分担報告書に記載した培養細胞を用いた結果と比較すると、今回の結果では全般的に%Input値が非常に低くなっている。この原因は、今回適用した組織可溶化条件では終夜脱架橋という過程が必要であり、この過程でDNAとAPE1の多くの架橋が外れてしまっている可能性が考えられる。しかしながら、その場合でもENU投与によるAPE1のrDNAへの結合量の増大が見られていることから、今回の可溶化条件でも本手法によりアルキル化DNA損傷応答反応を検出できることを意味する。従って、「拡大希釈および終夜脱架橋」の方法をベースとしたより詳細な組織可溶化の条件検討等により、現状よりも感度良くアルキル化DNA損傷応答反応の検出が可能となる可能性がある。

「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、エレミン投与群において用量依存的に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持たない通常のラット試料を用いても、ゲノム遺伝子上で変異原性を評

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、エレミン特有の変異であるT>A, T>Cの変異が用量依存的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およびその用量反応性について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、HLMN assayと肝臓小核試験の結果に高い相関があることを確認した。また、既報と同様に、遺伝毒性肝発がん物質だけでなく、非遺伝毒性肝発がん物質でもMNHEPの増加が認められたことは、MNHEPの検出が化学物質の発がん性評価に応用できることを示唆する結果であった。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、Myc遺伝子を含む染色体外環状DNA (ecDNA) の形成が明らかになった。chromothripsisでは、粉碎された染色体の再構成によってecDNAが生じることが知られており、本結果は、AAのラット肝発がんにおいてchromothripsisが寄与することを支持するものであった。「新規試験法評価のためのレポーター遺伝子変異原性試験」では、低用量群からG:C-C:G transversionの増加を特徴とする遺伝子変異が誘発されることを明らかにした。

## 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、ケーススタディの結果を踏まえ、「類似物質候補の代謝物に共通性が認められるケース」及び「炭素鎖長の異なる類似物質候補が得られるケース」に遭遇した場合のスクリーニング評価におけるRAによる有害性クラス付与の進め方(案)を提案することができた。この進め方の案は、あくまでも一研究者による検討結果であるため、国内外のRA評価事情や専門家からの客観的意見に基づき、必要に応じて改善することがありうる。

「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試験データから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。両者は概ね正の相関性を示す傾向がみられ、変異原性BMDL<sub>50</sub> (mg/kg/day) を係数100で除すると発がん性BMDL<sub>10</sub>を下回った。一方、BMDの信頼区間 (BMDU-BMDLの範囲) を考慮した結果、個々の物質の変異原性の強さを順位付けすることはできなかった。変異原性試験をより精度の高い定量的評価に用いるための試験設計を検討することは今後の課題と考えられた。

「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」については、使用された0.5および1.5 µg/mLシスプラチン用量は、TK6試験では明らかに陽性となる用量であることから、プロテオミクスとエンリッチメント解析系において、この用量域でDNA修復関連の生命活動変化を十分に捉えるためには、さらなる感度向上の条件検討や適切なサンプリング時間の設定が重要であることが明らかとなった。

「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」では、「拡大希釈および終夜脱架橋」による固定組織の可溶化とDNA切断条件を検討した。その結果、ChIP法への適用可能性が見出された。この可溶化条件を、APE1を認識するモノクローナル抗体を用いたChIP法に適用した結果、ENU投与マウス組織において、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。将来的に、解析数を増やして堅牢性を確認する必要があるが、ChIP法による遺伝毒性応答反応解析系のホルマリン固定化組織標本への潜在性が示された。

「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」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) の解析を行った。

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前年度までに示されていたが、今回、用量反応性についても検出可能であることが示され、代替手法として現状求められる要件を満たしていることが示された。一方で、未だ限定的なサンプル・データしかなく、国際ガイドライン化に対しては課題も残る。この中で、ガイドライン化に資する基礎データ拡充のためには、さらに多くの化合物及び臓器に対してデータを蓄積し有用性を示すとともに、標準プロトコールの提案を含めた手法の普及を図る必要がある。

「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、HLMN assayを用いることで、28日間反復投与試験で得られる肝組織切片においてMNHEPの割合を評価できることを確認した。また、肝臓小核試験と同様、本法は肝発がん性評価への応用も期待された。「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誘発肝腫瘍におけるecDNAの形成を明らかにし、発がん過程におけるchromothripsisの関与を支持する結果を得た。「新規試験法評価のためのレポーター遺伝子変異原性試験」では、qunolineのレポーター遺伝子変異原性試験を実施し、その結果と凍結サンプルを班員に提供した。

## 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: Re-evaluation of the reduced heart weights in male rats in a 28-day oral repeated-dose toxicity study of

- tetramethylammonium hydroxide. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 153: 105712, 2024
2. Kawashima A, Inoue K, Ushida K, Kai K, Yoshida-Yamashita LS, Masumura K: Derivation of human health hazard assessment values of tetramethylammonium hydroxide (TMAH) under the Japan Chemical Substances Control Law. *Fundamental Toxicol Sci.* 11: 267-278, 2024
  3. Hosoi S, Hirose T, Matsumura S, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Suzuki T, Masumura K, Sugiyama KI: Effect of sequencing platforms on the sensitivity of chemical mutation detection using Hawk-Seq™. *Genes Environ.* 2024;46:20.
  4. 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 Environ.* 2024;46:7.
  5. 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.* 2024;894:503729.
  6. Iwasaki K, Tojo A, Kobayashi H, Shimizu K, Kamimura Y, Horikoshi Y, Fukuto A, Sun J, Yasui M, Honma M, Okabe A, Fujiki R, Nakajima NI, Kaneda A, Tashiro S, Sassa A, Ura K. Dose-dependent effects of histone methyltransferase NSD2 on site-specific double-strand break repair. *Genes Cells.* 2024 Nov;29(11):951-965. doi: 10.1111/gtc.13156.
  7. Nakano T, Akamatsu K, Kohzaki M, Tsuda M, Hirayama R, Sassa A, Yasui M, Shoukamy MI, Hiromoto T, Tamada T, Ide H, Shikazono N. Deciphering repair pathways of clustered DNA damage in human TK6 cells: insights from atomic force microscopy direct visualization. *Nucleic Acids Res.* 2025 Jan 7;53(1):gkae1077. doi: 10.1093/nar/gkae1077.
  8. 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
  9. Furihata C., Suzuki T. Four functional genotoxic marker genes (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) discriminate genotoxic hepatocarcinogens from non-genotoxic hepatocarcinogens and non-genotoxic non-hepatocarcinogens in rat public toxicogenomics data, Open TG-GATEs. *Genes Environ.* 2024; 46: 28.
  10. Hosoi S, Hirose T, Matsumura S, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Suzuki T, Masumura K, Sugiyama KI Effect of sequencing platforms on the sensitivity of chemical mutation detection using Hawk-Seq™. *Genes Environ.* 2024;46:20.
  11. Corton JC, Auerbach SS, Koyama N., Mezencev R., Yauk CL., Suzuki T Review and meta-analysis of gene expression biomarkers predictive of chemical-induced genotoxicity in vivo. *Environ. Mol. Mutagen.* 2025: doi: 10.1002/em.22646
  12. Froetschl R., Corton JC., Li H., Aubrecht J., Scott S. Auerbach SS., Caiment F., Doktorova TY., Fujita Y., Jennen D., Koyama N., Meier MJ., Mezencev R., Recio L., Suzuki T., Yauk CL. Consensus

- findings of an IWGT Workshop on using Transcriptomic Biomarkers to Predict Genotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 2025; doi: 10.1002/em.22645
13. 築茂由則, 吉田徳幸, 大岡伸通, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 米満研三, 上間匡, 本間正充, 合田幸広, 井上貴雄: 共通ウイルスゲノムRNAを用いたCOVID-19診断用核酸増幅検査薬の一斉性能評価試験. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2024;55:295-310
  14. Shimizu N, Izawa K, Washif M, Morozumi R, Hirota K, Tsuda T: Role of TDP2 in the repair of DNA damage induced by the radiomimetic drug Bleomycin. *Genes Environ.* 28;47(1):7. 2025
  15. Nakamura K., Ishii Y., Takasu S., Namiki M., Soma M., Takimoto N., Matsushita K., Shibutani M., Ogawa K. Chromosome aberrations cause tumorigenesis through chromosomal rearrangements in the hepatocarcinogenesis rat model. *Cancer Sci.* 2024, 115, 3612-3621, doi: 10.1111/cas.16324
- G-2. 学会発表
1. 牛田和夫, 甲斐薫, 山下ルシア幸子, 川島明, 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: UR/SF適用の妥当性検討. 第51回日本毒性学会学術年会(2024.07)
  2. 山下ルシア幸子, 牛田和夫, 甲斐薫, 増村健一, 井上薫: 1-ノナノールと1-デカノールの人健康影響に係るスクリーニング評価: 異なる鎖長アルコールのリードアクロス(RA)による検討. 第51回日本毒性学会学術年会(2024.07)
  3. 磯貴子, 村田康允, 広瀬望, 馬野高昭, 津田雅貴, 堀端克良, 杉山圭一, 増村健一, 松本真理子: 酢酸コバルト(II)四水和物のin vivo変異原性評価. 第51回日本毒性学会学術年会(2024.07)
  4. 増村健一, 安東朋子, 堀端克良, 石井雄二, 杉山圭一: アクリルアミドが誘発する生殖系列突然変異の解析. 日本環境変異原ゲノム学会第53回大会(2024.12)
  5. 松本真理子, 磯貴子, 馬野高昭, 村田康允, 広瀬望, 増村健一, 堀端克良, 杉山圭一: トルエンジイソシアネート経口投与によるMutaMouse肝臓における変異原性. 日本環境変異原ゲノム学会第53回大会(2024.12)
  6. 田中陽菜, 山北啓吾, 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修復の機能不全によるDNA鎖切断を伴わない自然免疫応答メカニズムの解明. 第31回日本免疫毒性学会学術年会、西宮市 (2024.9.19)
  7. 古西乃々香, 北村蒼史, 鶴飼明子, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 浦聖恵, 佐々彰 O6-メチルグアニン DNAメチルトランスフェラーゼが炎症応答制御に果たす役割の解明 日本環境変異原ゲノム学会第53回大会、岡山市 (2024.12.8)
  8. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一: Detection of genotoxic reactions by analyzing DNA damage response using chromatin immunoprecipitation. 第51回日本毒性学会学術年会 (2024.7)
  9. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一: クロマチン免疫沈降法を利用したアルキル化剤誘発遺伝毒性反応の検出. 第83回日本癌学会学術総会 (2024.9)
  10. 堀端克良, 安東朋子, 吉田愛海, 杉山圭一: 遺伝情報発現に付随する突然変異誘発. 日本環境変異原ゲノム学会第53回大会 (2024.12)
  11. 羽倉昌志, 加藤雅之, 川上久美子, 皿田巳子, 須井哉, 杉山圭一, 堀端克良, 峯川和之, 山本美佳, 山田雅巳: TA100株の全ゲノム解析: 遺伝子変異のロット間比較(BMS pilot study). 日本環境変異原ゲノム学会第53回大会(2024.12)

12. 伊澤和輝. ecNGS ってなんだ? 日本環境変異原ゲノム学会 第 84 回 MMS 研究会, 2024 年 6 月 (東京)
13. 鈴木孝昌 様々な EC-NGS 法の特徴 日本環境変異原ゲノム学会第 84 回 MMS 研究会, 東京都 (2024. 6)
14. 鈴木孝昌 Error-corrected next generation sequencing (ecNGS)の現状 第 51 回日本毒性学会学術年会 福岡市 (2024.7)
15. 津田 雅貴. チロシル-DNA ホスホジエステラーゼが関与する新規 DNA 二本鎖切断修復経路.第 84 回日本癌学会学術総会 2024 年 9 月 21 日(福岡)
16. 鈴木孝昌, 尤馨悦, 伊澤和輝, 津田雅貴, 本間正充, 欒洋, 杉山圭一. PECC-Seq 法の開発から学ぶエラー修正 NGS(ecNGS)法の残存エラーの要因 第 83 回日本癌学会学術総会, 福岡市 (2024.9)
17. 津田 雅貴. DNA 二本鎖切断修復機構の理解を目指した多角的アプローチ. 日本放射線影響学会第 67 回大会. 2024 年 9 月 26 日 (小倉)
18. 津田雅貴. 三次元培養に関する最新論文紹介. MMS 研究会・3D 組織モデルを用いた遺伝毒性研究 第 3 回勉強会. 2024 年 10 月 4 日 TKP 品川カンファレンスセンター
19. 清水 直登、諸角 涼介、田村 孝平、中村 誠、鈴木 厚、石庭 寛子、井出 博、津田 雅貴. ネットアイツメガエルの中期胎胚転移時における DNA 二本鎖切断の修復経路の変化. 第 47 回 日本分子生物学会 2024 年 11 月 28 日 (福岡)
20. 伊澤 和輝、津田 雅貴、鈴木 孝昌、本間 正充、杉山 圭一. ラット試料を用いた ecNGS による in vivo 変異原性評価法の確立に向けた研究. 第 47 回 日本分子生物学会 2024 年 11 月 27 日 (福岡)
21. 津田 雅貴、清水 直登、濱田 優作、伊澤 和輝. TDP2 による DNA 修復メカニズムを活用した疾患治療の可能性第 47 回 日本分子生物学会 2024 年 11 月 27 日 (福岡)
22. 濱田 優作、津田 雅貴. 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. 第 47 回 日本分子生物学会 2024 年 11 月 27 日 (福岡)
23. 津田 雅貴、清水 直登、濱田 優作、伊澤 和輝. TDP2 による DNA 修復メカニズムを活用した疾患治療の可能性. 第 47 回 日本分子生物学会 2024 年 11 月 27 日 (福岡)
24. 伊澤和輝、津田雅貴、鈴木孝昌、本間正充、杉山圭一、NGS を用いたラット試験試料からの in vivo 変異原性データ取得への取り組み、第 52 回構造活性相関シンポジウム、2024 年 12 月 (神奈川)
25. 津田 雅貴. DNA の 3'末端に形成された損傷の修復機構. 日本環境変異原ゲノム学会 第 53 回大会 2024 年 12 月 7 日 (岡山)
26. 鈴木孝昌、杉山圭一. ナノポアシーケンサーを用いた簡便迅速な DNA メチル化解析手法の開発 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
27. 降旗千恵, 鈴木孝昌. In vivo トキシコゲノミクス試験に有用な 4 つの遺伝毒性マーカー遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, Cdkn1a) 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
28. 東航平, 鈴木孝昌, 青木康展, 山田雅巳. 魚類腸内細菌叢解析を用いた水環境中の界面活性剤のモニタリングに関する研究 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
29. 鈴木孝昌, 西川可穂子. 河川水のメタゲノム解析による細菌叢と薬剤耐性遺伝子の探索 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
30. 濱田 優作, 津田 雅貴. 相同組換え中間体解消における動的変化の可視化.

- 日本環境変異原ゲノム学会 第 53 回大会 2024 年 12 月 8 日 (岡山)
31. 津田 雅貴. DNA 二本鎖切断修復の機序と変異誘発. 日本環境変異原ゲノム学会 第 53 回大会 2024 年 12 月 7 日 (岡山)
  32. 伊澤和輝、データ解析におけるドメイン知識の重要性: ecNGS解析編、日本環境変異原ゲノム学会 第 53 回大会 Potential for Computational Genotoxicity シンポジウム、2024年12月 (岡山)
  33. アセトアミドのラット肝発がん過程における染色体再構成の関与の検討, 山上洋平, 石井雄二, 鈴木孝昌, 中村賢志, 原島洋文, 笠松建吾, 高須伸二, 相馬明玲, 杉山圭一, 村上智亮, 小川久美子, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 6 月, 福岡)
  34. 化学発がんにおけるクロモソリプシスの関与, 石井雄二, 第 53 回日本環境変異原ゲノム学会 (2024 年 12 月, 岡山)
  35. アセトアミド誘発の大型小核による chromothripsis の発生機構, 山上洋平, 石井雄二, 高須伸二, 相馬明玲, 笠松建吾, 豊田武士, 村上智亮, 小川久美子, 第 41 回日本毒性病理学会 (2025 年 1 月, 静岡)
  36. Investigations of the mechanism underlying acetamide-induced hepatocarcinogenesis in rat. Ishii Y., Nakamura K., Yamagami Y., Takasu S., Nohmi T., Toyoda T., Shibutani M., Ogawa K., SOT2025 (2025 年 3 月, 米国)
  37. Investigation of the involvement of chromothripsis in the acetamide-induced hepatocarcinogenesis in rats. Yamagami Y., Ishii Y., Nakamura K., Takasu S., Nohmi T., Toyoda T., Shibutani M., Ogawa K., SOT2025 (2025年3月, 米国)

**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**

該当なし