

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）  
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

分担研究課題名：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

研究分担者 増村健一 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部

**研究要旨**

*In vivo* 遺伝毒性試験の定量的評価指標の導出と発がん性評価への利用可能性を検討するため、トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験（TGR 試験）と発がん性試験の量的比較を行った。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（TD<sub>50</sub>）と比較した。肝発がん物質の標的臓器においては概ね正の相関がみられたが、標的臓器が異なるデータを加えるとばらつきが大きくなる傾向がみられた。文献情報から遺伝毒性発がん物質の変異原性 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す傾向がみられた。相関性に影響する不確実要因として、試験系、標的組織、発がんメカニズムの違いに加え、POD 算出に用いる試験データの選択の影響が考えられた。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方法を検討した。データ数は限られるものの、変異原性 BMDL<sub>50</sub> を係数 10～100 で除すると発がん性 TD<sub>50</sub> 値を下回り、また係数 100 で除すると発がん性 BMDL<sub>10</sub> を下回る傾向が示唆された。*In vivo* 遺伝毒性試験の量的指標を発がん性リスク評価に利用できる可能性が示唆された。

キーワード: TGR 試験、ベンチマークドーズ法、point of departure (POD)

**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。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。本研究においては、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す。本分担研究においては、*in vivo* 遺伝毒性試験結果から遺伝毒性 POD（Point of Departure）の設定を行ない、発がん性PODとの相関性から量的評価指標の導出が可能か検討する。

**B. 研究方法**

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、既知の遺伝毒性発がん物質について変異原性PODと発がん性PODを比較した。肝

発がん物質を用いた検討では、昨年度に続き、TGR試験の用量反応データから変異原性PODを算出し、肝発がん性PODと比較した。*N*-nitrosodimethylamine (NDMA)、*N*-nitrosodiethylamine (NDEA)、2-acetylaminofluorene (2-AAF)、2,4-diaminotoluene (2,4-DAT)を28日間経口投与したTGR試験(Mutaマウス、*lacZ*アッセイ)の肝臓における突然変異体頻度の用量反応データを用いて、ベンチマークドーズ(BMD)法によって変異原性PODを算出した(使用ソフト:PROAST web)。計算の際、平均化モデル(model averaging)を採用した。また、陰性対照値からの増加の程度を示す benchmark response (BMR) または critical effect size (CES) として0.5(陰性対照値と比べて50%増加)を設定し、変異原性PODとしてBMDL<sub>50</sub>を算出した。発がん性データは、マウスおよびラットの経口投与発がん試験の情報を carcinogenic potency database (CPDB)から収集し、肝発がんのPODとしてTD<sub>50</sub>およびBMDL<sub>10</sub>を算出した。変異原性PODと発がん性PODを比較した。標的組織が異なる例として、発がん標的が腎臓であるアリストロキア酸のTGR試験(*gpt delta*マウス、*gpt*アッセイ)(Chen et al. 2020)のデータを追加した。さらに、Health and Environmental Sciences Institute Genetic Toxicology Technical Committee (HESI GTTC)の定量的解析グループによる論文(Chepelev et al. 2023)から、遺伝毒性発がん物質12物質(2-acetylaminofluorene, Benzo[a]pyrene, Benzene, 1,3-Butadiene, Chlorambucil, 4-Chloro-*o*-phenylene-diamine, Cyclophosphamide, Chloroform, Leucomalachite green, *N*-nitrosodimethylamine, Trichloroethylene, Urethane)のTGR試験のPOD(BMDL<sub>50</sub>)と発がん性POD(BMDL<sub>10</sub>)と比較して相関性を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒトおよび実験動物を使用していないため対象外。

## C. 研究結果

TGR試験の用量反応データから変異原性PODを算出した。BMDの算出基準となるBMR/CES(背景値からの一定の反応の程度)は、2022年のInternational Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT)会議で*in vivo*遺伝毒性試験の用量反応データへの適用が妥当された0.5(陰性対照値と比べて50%増加)を用いた。肝発がん物質において、変異原性POD(BMDL<sub>50</sub>)と発がん性POD(TD<sub>50</sub>)は概ね正の相関性を示した。CPDBには複数の発がん試験から得られた異なるTD<sub>50</sub>が記載されており、その値には数10倍~数100倍のばらつきが認められた。そのため複数のTD<sub>50</sub>の平均値と範囲を発がん性PODとして変異原性BMDL<sub>50</sub>と比較した(図1)。さらに、標的組織が異なる遺伝毒性発がん物質として、腎発がん物質であるアリストロキア酸のデータを加えた。雄*gpt delta mouse*(各群5匹)に28日間経口投与して3日後に採取した腎臓の*gpt*遺伝子突然変異頻度の用量反応データを用いて、BMD法を用いて変異原性POD(BMDL<sub>50</sub>)を算出した。発がん性PoDはCPDBのharmonic TD<sub>50</sub>を使用した。変異原性POD(BMDL<sub>50</sub>)と発がん性POD(TD<sub>50</sub>)の相関性を示した(図1)。その結果、アリストロキア酸のデータを加えると正の相関傾向はあるものの、ばらつきは大きくなった。発がん性TD<sub>50</sub>値のばらつきを考慮して、両者の相関性から変異原性PODと発がん性PODの量的関係を検討した結果、変異原性BMDL<sub>50</sub>(mg/kg/day)を係数10~100で除するとTD<sub>50</sub>値を下回る傾向が見られた。この傾向をさらに検討するため、HESI GTTCにおける定量的解析グループの論文情報から遺伝毒性発がん物質12物質のTGR試験のPODを収集した。これらは投与経路、投与期間、解析組織が異なるデータが混在している。複数の用量反応データがある場合はBMDLの最小値を採用した。また、発がん性PODとしてはBMDL<sub>10</sub>を用いた。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（図2）。また、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>を下回る傾向が見られた。

#### D. 考察

*In vivo* 遺伝毒性試験と発がん性試験の量的比較を検討するにあたって、発がんのイニシエーションイベントである遺伝子突然変異の誘発を指標とすることが適当と考え、*in vivo* 遺伝子突然変異試験であるTGR試験の用量反応データから変異原性PODを算出した。用量反応データからBMD法でPOD（BMDL）を算出する際、陰性対照値からの一定の増加の程度を示すBMR/CESをどのように設定するかについてはこれまで国際的なコンセンサスがなかったが、発がん性試験の用量反応データに対して多く用いられるBMDL<sub>10</sub>（対象値から10%増加）は、遺伝毒性試験のデータに対しては値が小さく適切な用量反応モデル選択が難しいとの指摘があった。適切なCESは各試験系の特徴によって異なり、バックグラウンドデータのばらつきと陽性検出のダイナミックレンジを考慮して設定されるものと考えられた。HESI GTTC等での検討を経て、2022年のIWGT会議では*in vivo*試験（小核試験、コメント試験、*Pig-a*試験、TGR試験）について、BMD解析におけるCESの値として0.5を用いること、すなわちBMDL<sub>50</sub>（対象値から50%増加）が支持された。なお、*in vitro* 遺伝毒性試験の用量反応データにおけるCESについてはデータが不足しており議論が継続中である。したがって、*in vivo* 変異原性と発がん性を比較する場合、変異原性PODとしてBMDL<sub>50</sub>、発がん性PODとしてTD<sub>50</sub>とBMDL<sub>10</sub>を用いることが妥当と考えられた。

*In vivo*試験において異なるエンドポイントを比較する際、標的組織を考慮することで結果のばらつきを低減できる可能性がある。既知の遺伝毒性肝発がん物質4物質を用いた検討では、肝臓におけるTGR試験データから変異原性PODを算出し、肝臓におけ

る発がんデータから発がん性PODを算出した。同じ標的臓器で比較を行い、変異原性POD（BMDL<sub>50</sub>）と発がん性POD（TD<sub>50</sub>、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POD（BMDL<sub>50</sub>）を100倍の係数で除した場合、いずれも発がん性POD（TD<sub>50</sub>）を下回った。さらに標的臓器が異なる場合にどのような傾向がみられるかを検討するため、発がん標的が腎臓であるアリストロキア酸について、腎臓における発がん性とTGR試験データを追加して比較した。その結果、アリストロキア酸のデータを加えても一定の正の相関傾向はありと考えられたものの、ばらつきは大きくなった。使用したマウス系統とレポーター遺伝子が異なるため、結果の解釈には注意が必要である。相関性の比較において、検出系の違いに加えて、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。また、*in vivo* 遺伝毒性試験と発がん性試験の量的比較を行う際、同一物質でも試験データによってPODが大きく異なることが不確実性の要因となる。例えば、異なる発がん試験や異なる発がん標的臓器から算出された複数のTD<sub>50</sub>値には数10倍～数100倍の差がある。定量的評価においては用量反応データの選択が適切かどうか検討することが重要と考えるが、試験データが限られる場合は適切なデータ選択が難しい問題がある。POD値は相当なばらつきを含むものと考え、精緻な試算より包括的な係数を用いた比較が実際的な対応策の一案と考えられた。肝発がん物質を用いた検討で得られた相関性を検証するため、HESI GTTCの定量的解析グループの論文情報から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（TD<sub>50</sub>、BMDL<sub>10</sub>）を比較した。その結果、両者は概ね正の相関性を示すことが示唆された。変異原性BMDL<sub>50</sub>（mg/kg/day）を係数10～100で除するとTD<sub>50</sub>値を下回り、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。このことは、限られたデー

タに基づく結果ではあるが、TGR試験から算出された変異原性PODを発がん性評価の量的指標に利用できる可能性を示唆している。一方で、TGR試験は解析組織が限られており、投与経路や投与期間が異なるデータが混在する点は発がん性評価に応用するにあたっての課題と考える。

変異原性PODと発がん性PODの相関関係には多くの不確実要因が含まれるため、精度の高い換算等の量的比較に用いるには限界があると考えられた。量的比較の利用例としては、発がん性未知の評価対象物質に対して発がん性データがあるサロゲート物質が存在するとき、発がん性POD既知物質の変異原性PODと発がん性未知物質の変異原性PODを比較することによって発がん性未知物質の発がん性の強さの順位を推定する場面などが考えられる。例えば、物質Aの変異原性PODが物質Bの変異原性PODの100倍高ければ、物質Aの発がん性は物質Bより弱いと推定することには一定の説得力があると考えられる。現在の医薬品の変異原性不純物に関するICH M7ガイドラインにおいては、変異原性PODに基づいて許容摂取量を求めることは認められていない。リスク評価と規制における受け入れ可能性は明らかでなく、今後の議論が必要と考えられる。発がん性PODと変異原性PODの量的相関性に関する知見が蓄積されることで、変異原性の量的指標をリスク評価に利用する議論が進むことが期待される。

## E. 結論

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。肝発がん物質の標的臓器において概ね正の相関がみられたが、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。文献情報に基づいて遺伝毒性発がん物質の変異原性POD (BMDL<sub>50</sub>)と発がん性POD (TD<sub>50</sub>, BMDL<sub>10</sub>)を比較した結果、両者は概ね正の相関性を示す傾向

がみられた。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方法を検討した。変異原性BMDL<sub>50</sub>を係数10~100で除するとTD<sub>50</sub>値を下回り、また係数100で除すると発がん性BMDL<sub>10</sub>を下回る傾向が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Murata Y, Suzuki K, Shigeta Y, Iso T, Hirose N, Umano T, Horibata K, Sugiyama K, 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 Environ* 2023;45:29.
2. 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.* 2023;Early View: doi: 10.1002/em.22578.
3. 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.* 2023;51:e109.
4. Murata Y, Natsume M, Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Umano T, Horibata K, Sugiyama K, Masumura K, Hirose A, Matsumoto M: *In vivo* mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver and lung. *Genes Environ* 2023;45:12.
5. 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* 2023 10: 91-103.

## G-2. 学会発表

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 村田康允, 重田善之, 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: トランスジェニックマウスを用いた*tert*-ブチルヒドロペルオキシドの遺伝子突然変異試験. 第50回日本毒性学会学術年会(2023.06)
5. 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:  $\alpha$ - (ノニルフェニル) - $\omega$ -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)
6. 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: アゾジカルボンアミドの*in vivo*遺伝毒性評価. 第50回日本毒性学会学術年会(2023.06)
7. 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TD<sub>50</sub>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)
8. 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, 増村健一: 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)
9. Murata Y, Matsumoto M, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Hasegawa S, Umamo T, Horibata K, Sugiyama K, Inoue K, Hirose A, Masumura K: In vivo mutagenicity assessment and derivation of reference dose of styrene. 57th Congress of the European Societies of Toxicology (2023.09)
10. 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)
11. 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)
12. 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)

## **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

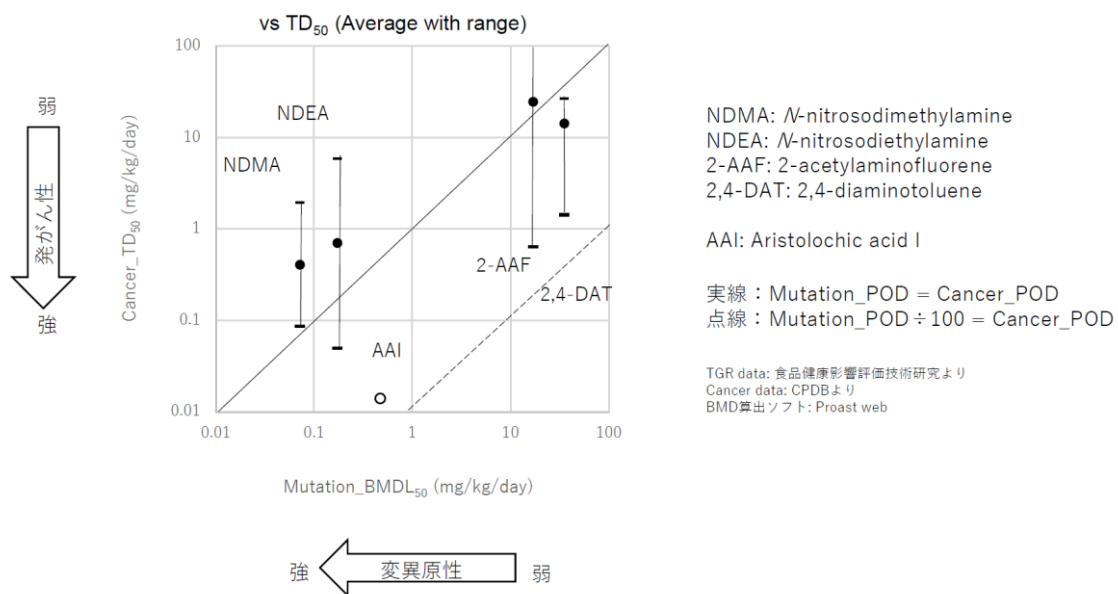
該当なし

### H-3.その他

該当なし

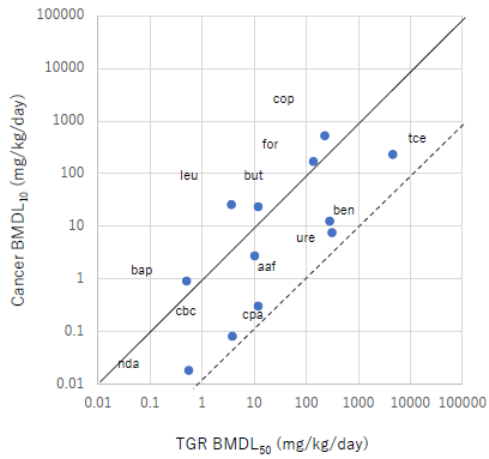
別添 4

図 1 : 変異原性POD (BMDL<sub>50</sub>) と発がん性POD (TD<sub>50</sub>) の比較



別添 4

図2：変異原性POD (BMDL<sub>50</sub>) と発がん性POD (BMDL<sub>10</sub>) の比較



aaf: 2-acetylaminofluorene:  
 bap: Benzo[a]pyrene  
 ben: Benzene  
 but: 1,3-Butadiene  
 cbc: Chlorambucil  
 cop: 4-Chloro-o-phenylene-diamine  
 cpa: Cyclophosphamide  
 for: Chloroform  
 leu: Leucomalachite green  
 nda: *N*-nitrosodimethylamine  
 tce: Trichloroethylene  
 ure: Urethane

実線 : Mutation\_POD = Cancer\_POD  
 点線 : Mutation\_POD ÷ 100 = Cancer\_POD

Chepelev et al. EMM 2023 の数値データをもとに作成  
 (投与経路、投与期間、解析組織が異なるデータ混在)



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）  
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

**分担報告書名：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**

研究分担者 井上 薫 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部

**研究要旨**

本分担研究は、化審法における QSAR やリードアクロス (RA) など *in silico* 評価手法の新たな活用場面を提案することを目的としている。

令和 4 年度に実施した国内外のリスク評価機関における *in silico* 評価手法の活用状況調査の結果、RA やグルーピングは、類似性等を含め妥当性がある評価結果が少ない現状から考えると、容易に活用できる方法ではないながらも、化審法のスクリーニング評価項目である一般毒性、生殖発生毒性、遺伝毒性、発がん性に適用可能であると考えられた。そこで、令和 5 年度以降は、スクリーニング評価において RA を活用促進することを目指し、化審法のスクリーニング評価に供することを前提とした、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し、その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）の検討を行うこととした。

ケーススタディの対象物質として、過去の化審法スクリーニング評価において評価保留となっていた 2 物質（ジイソブチル＝ヘキサンジオアート (CASRN: 141-04-8) 及びノナン-1-オール (CASRN: 143-08-8)）を選定した。各対象物質について、OECD が開発した QSAR Toolbox を活用して類似物質候補の検索を行い、類似物質候補の絞り込み条件を検討した。その結果、ジイソブチル＝ヘキサンジオアートについては 6 物質、ノナン-1-オールについては C5～22 の直鎖アルコールを最終的な類似物質候補とした。類似物質候補について、一般毒性、生殖発生毒性、遺伝毒性、発がん性に関する情報を収集した。有害性情報は、基本的には化審法のスクリーニング評価と同様、国内外のリスク評価機関が作成した評価資料等の信頼性が担保された情報源から収集した。また、OECD Toolbox から得られる有害性情報も活用した。ジイソブチル＝ヘキサンジオアートについては、類似物質候補の体内動態や物化性状についても調査した。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。また、有害性情報については、スクリーニング評価の際に使用する個別シートに各情報を整理した。

現在、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。

## A. 研究目的

本分担研究は、化審法における QSAR やリードアクロス (RA) など *in silico* 評価手法の新たな活用場面を提案することを目的としている。

令和 4 年度は、*in silico* 評価手法が、国内外のリスク評価機関でどのように活用されているかを調査した。その結果、QSAR については、化審法での有害性評価項目(一般毒性、生殖発生毒性、発がん性)のうち、遺伝毒性の Ames 試験結果を予測する以外に直ちに活用することは困難な状況であり、新たな活用場面の提案は難しいことが分かった。また、RA やグルーピングは、類似性等を含め妥当性がある評価結果が少ない現状から考えると、容易に活用できる方法ではないことが明らかになったが、化審法のスクリーニング評価項目である一般毒性、生殖発生毒性、発がん性に適用可能であると考えられた。

この調査結果を受けて、令和 5 年度以降の本分担研究では、スクリーニング評価において 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はなく、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 Read across/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。

## B. 研究方法

RA のケーススタディの対象物質として、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))を選定した。これら

は、過去の化審法のためのスクリーニング評価において、当該物質そのものの毒性情報が無かったため、簡易的な RA による評価結果を提案したものの、予審委員により類似物質の妥当性等が認められなかったため評価保留となっていた物質である。

はじめに、各対象物質について、類似物質候補の検索を行った。類似物質候補の検索は、OECD が開発した QSAR Toolbox が有用と考え、このツールを活用した。QSAR Toolbox では、毒性情報等の有無やプロファイル等の共通性により類似候補物質を絞り込むことができる。そのため、各物質について、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。有害性情報の収集は、基本的には化審法のスクリーニング評価と同様、信頼性が担保された情

報

源

([https://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/kasinhou/files/information/ra/reliability\\_criteria03.pdf](https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/information/ra/reliability_criteria03.pdf)) から収集した。また、OECD Toolbox から得られる有害性情報も活用した。ジイソブチル=ヘキサジ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。また、有害性情報については、スクリーニング評価の際に使用する個別シート(物質毎に用意するエクセルファイル: 毒性項目ごとに、得られた毒性試験情報を整理し、スクリーニング評価の評価資料となるもの)に各情報を整理した。

## C. 結果

### 1. ジイソブチル=ヘキサジジオアート

#### 1-1. 毒性プロファイルの確認

本物質については、過去のスクリーニング評価において、通常の有害性情報検索・収集では有害性情報が無かったため、CAS. 105-99-7 アジピン酸ジブチルの有害性

情報を活用した評価結果を提示したところ、類似物質が1つだけであり、分解物の毒性情報を示していなかったことから、評価保留となった。

本検討では、はじめに OECD QSAR Toolbox のプロファイリング機能を用いて、本物質が有すると考えられる毒性学的特徴を確認した。その結果、発がん性に関するプロファイラ Carcinogenicity (genotox and nongenotox) alerts by ISS から Structure alert for nongenotoxic carcinogenicity (化学構造に少なくとも非遺伝毒性発がん性に関する警告構造がある) 及び Phthalate (or buthyl) diesters and monoesters (Nongenotoxic)が、生殖発生毒性に関するプロファイラ DART scheme から Known precedent reproductive and developmental toxic potential (生殖発生毒性に関する既知の先例がある) 及び Di-carboxylic acid derivatives (adipates)(22d) (ジカルボン酸誘導体 (アジピン酸塩)) が提示された。



#### 図. Di-carboxylic acid derivatives (adipates)

以下に、OECD Toolbox から得られた各プロファイルの概要を示す。

発がん性の Phthalate (or buthyl) diesters and monoesters (Nongenotoxic)については、フタル酸 (又はブチル) ジエステル及びモノエステルについて定義されたものであり、フタル酸ジ (2-エチルヘキシル) (DEHP) やフタル酸ジ (2-イソノニル) (DINP) などのフタル酸エステルは、げっ歯類の肝臓においてペルオキシソーム増生を引き起こすことや、長期投与により肝発がんを引き起こすことが報告されている。これらは遺伝毒性

試験で通常は陰性であることから、非遺伝毒性物質と考えられている。また、その発がん機序は、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR $\alpha$ ) が、げっ歯類の肝臓におけるペルオキシソーム増生作用の大部分を担っていると考えられているが、ヒトにおけるペルオキシソーム増生作用の感受性は低いことから発がん性の懸念は高くないと考えられている。

生殖発生毒性の Di-carboxylic acid derivatives (adipates)(22d)については、脂肪族カルボン酸とその誘導体 (酸部分の炭素原子が 9 個以下のもの) に催奇形性が認められることに基づき定義されたものである。ジイソブチル=ヘキサジオアートはサブカテゴリーのひとつである Alpha-halogenated acetic acid derivatives に含まれる。Alpha-halogenated acetic acid derivatives では、エステル部分の炭素数は C1-C8 の範囲内と定義されており、中心的な構造的特徴としてアジピン酸 (CAS 番号 124-04-9) が挙げられている。また、アジピン酸に結合するアルキル鎖は、非分岐又は分岐アルキル鎖であることが許容されている。アジピン酸エステルについて、高濃度ばく露により、胚や胎児の骨格や内臓の肉眼的異常、胎児の大きさの減少、死亡や吸収が報告されている。発生毒性物質の例として、Diethylhexyl adipate (別名アジピン酸ジ (2-エチルヘキシル))(CAS RN: 103-23-1) が挙げられている。

以上のことから、以降の類似物質候補の検索には「生殖発生毒性」がキーになることが見込まれた。

#### 1-2. 類似物質候補の検索

次に、OECD QSAR Toolbox を用いて、ジイソブチル=ヘキサジオアートの類似物質候補の検索を行った。本物質はアジピン酸骨格を有し、前述の通りこの骨格を有する物質に生殖発生毒性が確認されたことから、検索の第一段階では、アジピン酸骨格を有するすべての物質を抽出することとした。その結果、139 物質が抽出されたが、ジイソ

ブチル＝ヘキサンジオアートにはない複素環式の構造を有する物質を除外した結果、67物質が得られた。さらに、ジイソブチル＝ヘキサンジオアートと同じ **Alpha-halogenated acetic acid derivatives** のみを有する物質を抽出した結果、ジイソブチル＝ヘキサンジオアートを含む 18 物質の情報が得られた。このうち、CAS 番号が付され、OECD Toolbox 上で一般毒性、生殖発生毒性、発がん性いずれかの情報を有することが確認できた 6 物質を、ジイソブチル＝ヘキサンジオアートの最終的な類似物質候補とした (表 1)。

### 1-3. 有害性情報等の収集・整理

類似物質候補の 6 物質について、分子量や物理化学的性状、有害性情報を検索・収集し整理した。その結果の概要を表 1 に示す。6 物質の分子量については、米国 National Institutes of Health (NIH)が開発した化学物質に関する公開データベース PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)を用いて調査した。また、物理化学的性状については、物理的性状、沸点、融点または凝固点、溶解度、蒸気圧、オクタノール/水分配係数について、欧州化学機関 (European Chemicals Agency, ECHA)による公開データベース (<https://echa.europa.eu/information-on-chemicals>)を用いて調査したが、評価対象物質であるジイソブチル＝ヘキサンジオアートを含む 3 物質については情報が得られなかった。

一般毒性、生殖発生毒性、発がん性については、前述の情報源を調査し、各毒性項目に関する情報を収集した。その結果、現時点までの調査においては、一般毒性については 3 物質、生殖発生毒性については 6 物質、発がん性については 1 物質に情報があることを確認できた (表 1)。

一般毒性については、Dimethyl adipate に関する吸入暴露のラット 90 日間反復投与毒性試験 (ECHA データベースより)の情報があつたが、エアロゾルを暴露した 1 用量

の試験であつたため、参考扱いにすることとした。また、情報が得られた 3 物質の一般毒性試験は、いずれもラットを用いた 28 日間または 90 日間試験であつた。これらはスクリーニング評価に資する情報であると考えられ、評価対象物質であるジイソブチル＝ヘキサンジオアートに比しアルキル鎖長部分が短い Diisopropyl adipate (CAS RN: 6938-94-9) 及び Dibutyl adipate (CAS RN: 105-99-7) と、アルキル鎖長部分が長い Diethylhexyl adipate (CAS RN: 103-23-1)に情報があつた。したがって、これら類似物質候補に関する得られた情報の内容を精査し、毒性所見の類似性を含めて確認し、内挿によりジイソブチル＝ヘキサンジオアートの一般毒性の評価が可能かを検討することとした (後述)。

生殖発生毒性に関する情報のうち、4 物質に関する発生毒性について述べられていた文献 (Singh et al. 1973 : OECD Toolbox から入手)については、研究報告としては古いため、今後試験条件等の精査を行い、得られた試験結果が妥当であるか評価する必要がある。また、生殖発生毒性について、化審法のスクリーニング評価では経世代影響を評価する必要があるが、今回得られた情報のうち経世代影響が評価できるのは Dibutyl adipate (CAS. 105-99-7)に関する生殖毒性スクリーニング試験 (厚労省の既存化学物質安全性点検事業で実施) と、Diethylhexyl adipate (CAS RN: 103-23-1)に関する一世代生殖毒性試験 (AICIS IMAP (2013)、OECD SIDS(2005)から入手) だけであつた。したがって、これらの試験結果を精査し、類推により評価対象物質であるジイソブチル＝ヘキサンジオアートの経世代影響を評価可能か、今後検討する。

発がん性については、Diethylhexyl adipate (CAS RN: 103-23-1)のみに情報があつて、マウスとラットを用いた発がん性試験 (NTP-TR (1982))が得られた。また、本物質の発がん性については、IARC による発がん性区分 3 (ヒトに対する発がん性について分類でき

ない)、米国 EPA による発がん性区分 C (ヒト発がん性がある可能性がある物質) とされており、前述の発がん性試験試験の精査が必要な状況である。今年度の検討では、QSAR Toolbox から、Dibutyl adipate, Diisopropyl adipate, Diisobutyl adipate, Diethylhexyl adipate について Ames 試験陰性と示されていたものの、6 物質の遺伝毒性の詳細に関しては調査していない。したがって、今後の検討では類似物質候補 6 物質の遺伝毒性についても情報源を調査し、得られた情報に基づき遺伝毒性を評価する。さらに、発がん性に関しては、Diethylhexyl adipate 単独での発がん性に関する結論や、類推によるジイソブチル=ヘキサンジオアートの発がん性評価の可否を、遺伝毒性評価の結果を踏まえて行うこととする。

#### 1-4. リードアクロスによる一般毒性に関する評価の試み

前述の通り、一般毒性については、アルキル鎖長部分が短長の類似物質候補に関する毒性試験情報からジイソブチル=ヘキサンジオアートの毒性の類推ができる可能性が確認できたため、各試験情報について内容を精査した。

##### 1) Dibutyl adipate (CAS. 105-99-7)のラット 28 日間反復投与試験 (経口)

本物質については、既存化学物質安全性点検事業による試験結果があった。雌雄ラットに最高 1000 mg/kg/day の用量で 28 日間強制経口投与を行った結果、いずれの検査項目においても雌雄ともに投与群に毒性影響はみられなかったことから、本試験の NOAEL は 1000 mg/kg/day と判断できると考えられた。その他に、本物質の一般毒性に関する情報はなかった。

##### 2) Diisopropyl adipate (CAS RN: 6938-94-9)のラット 28 日間反復投与試験 (経口)

この試験情報は 2023 年 11 月に ECHA のデータベースから入手したが、2024 年 3 月末時点では同データベースから削除されて

いた。しかし、情報の信頼性が高い reliability 1 の試験情報であったため、本検討では採用することとした。

雌雄ラットに 1000 mg/kg/day の用量で 28 日間強制経口投与を行った結果、いずれの検査項目においても雌雄ともに投与群に毒性影響はみられなかったことから、本試験の NOAEL は 1000 mg/kg/day と判断できると考えられた。ただし、本試験は 1 用量で実施された試験であるため、類推の際の参考情報として扱うが、スクリーニング評価のための定量的評価の根拠とはしなかった。その他に、本物質の一般毒性に関する情報はなかった。

##### 3) Diethylhexyl adipate (CAS RN: 103-23-1)の一般毒性

本物質については、比較的多くの有害性情報が存在した。

一般毒性については、多くの評価機関が米国 National Toxicology Program (NTP) が 1982 年に実施、報告した亜慢性毒性試験、発がん性試験を中心に評価していた。

NTP (1982)によると、ラット及びマウスを用いた亜慢性毒性試験 (91 日間反復混餌投与：後述の発がん性試験のための用量設定試験) では、雌雄のラットまたはマウス (各群 10 匹/群/性) に本物質を 0, 1,600, 3,100, 6,300, 12,500, 25,000 ppm の用量で投与した結果、10%以上の体重増加抑制がラットでは 12500 ppm 以上で、マウスでは 3100 ppm 以上で認められたことから、本試験の NOAEL はラット 6300 ppm (環境省の換算では 400 mg/kg/day)、マウス 1600 ppm (環境省の換算では 400 mg/kg/day) であると判断された (ただし、この試験の NOAEL 判断は、評価機関により異なっていた)。

また、発がん性試験については、雌雄のラットまたはマウス (各群 50 匹/群/性) に本物質を 0, 12,500, 25,000 ppm の用量で投与した結果、ラット、マウス共に高用量群で試験期間を通して体重の低値が認められた。その他に投与に関連した毒性影響 (発がん

影響除く)は認められなかったことから、本試験の一般毒性に関する NOAEL は 12500 ppm (環境省の換算では、ラット：697 mg/kg/day、マウス：2659 mg/kg/day)と判断した。

その他、本物質の一般毒性に関する反復投与試験としては、マウス及びラットへの 6 週間混餌投与試験の結果を得ることができたが、前述の NTP (1982)の試験より投与期間が短く、検査項目(対象臓器)が限られていたことから、参考扱いとした。

また、化審法のスクリーニング評価では、他機関が評価値を設定していた場合は、その値を優先して採用して一般毒性の有害性評価値とするが、本物質については EPA IRIS (1992)が Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD)を 0.6 mg/kg/day としていた。この RfD の根拠試験は、ラットを用いた発生毒性試験 (ICI, 1988a)と 1 世代生殖毒性試験 (ICI, 1988b)であったが、エンドポイントとして一般毒性に関する所見(1 世代生殖毒性試験における親動物の体重および肝重量の変化)も含まれていたため、この試験内容を精査した。

EPA IRIS (1992)によると、雌雄ラット(雄：15 匹/群、雌：30 匹/群)に本物質を 0, 28, 170, 1080 mg/kg/day の用量で 10 週間混餌投与した後、交配し、児動物を生後 36 日まで観察(試験期間中は投与を継続：投与期間は 18-19 週間)した試験 (ICI, 1988b)の最高用量群において、一般毒性所見として母動物の妊娠期間中の体重増加抑制と雌雄親動物の肝重量の増加が認められた。また、児動物への影響として、最高用量群に体重増加抑制、同腹児の総体重および産子数の減少がみられた。以上の結果から同試験の NOAEL は 170 mg/kg/day と判断された。なお、スクリーニング評価においては、妊娠等による影響を受けない所見を一般毒性のエンドポイントとして扱うため、この試験については雄親動物の肝重量の増加が採用すべきエンドポイントとなる。

## 1-5. 体内動態

類似物質候補 6 物質について、OECD QSAR Toolbox のデータベースからは代謝物の実測データは得られなかった。また、OECD QSAR Toolbox による代謝物予測において、類似物質候補 6 物質は、ジイソブチル=ヘキサンジオアートと同様に、アジピン酸とアルコール部分を含む代謝物が推定された。

有害性情報検索の結果、現時点では Diisopropyl adipate (CAS. 6938-94-9)、Diethylhexyl adipate (CAS. 103-23-1)の体内動態に関する情報が得られた。Diisopropyl adipate については、経口吸収後にエステル結合の段階的な加水分解を受け、アルコールとジカルボン酸が形成されることが確認できた (ECHA (Access in Feb 2024))。また、Diethylhexyl adipate については、アジピン酸モノ (2-エチルヘキシル) 及び 2-エチルヘキサノールへ代謝され、アジピン酸モノ (2-エチルヘキシル) は更にアジピン酸と 2-エチルヘキサノールへ代謝され尿中排泄されとの情報があつた (NITE 初期リスク評価書 (2007))。

以上のことから、今後の検討においては、ジイソブチル=ヘキサンジオアート及び類似物質候補 6 物質の代謝物(アジピン酸やアルコール)についても、有害性情報を収集・整理し、代謝物の毒性の有無や、毒性があつた場合は親化合物の毒性に影響を及ぼすか等々を評価する。

## 2. ノナン-1-オール

### 2-1. 毒性プロファイルの確認

本物質は、過去のスクリーニング評価において、一般毒性と生殖発生毒性には炭素鎖長12 (C12)アルコール 1 物質に基づく評価値を、遺伝毒性には C8 やその分岐アルコールの毒性情報を代用した RA による評価案を示したが、専門家判断により RA 適用の科



## 別添 4

学的根拠が不十分とされ、評価保留となった。そのため、RAに関してより妥当性がある評価結果が必要である。

本物質の構造をOECD QSAR Toolboxに入力し、プロファイリングを行った結果、反復投与毒性に関わるプロファイラ「Long Chain Alcohols (C6-22 primary aliphatic alcohols) (less susceptible) No rank」及び「n-Alkanols (Hepatotoxicity) No Rank」がヒットした。

「Long Chain Alcohols (C6-22 primary aliphatic alcohols) (less susceptible) No rank」については、毒性は低く、鎖長が短いアルコールは、鎖長が長い物質と比較して、より顕著な影響を引き起こす傾向があると説明されていた。また、「n-Alkanols (Hepatotoxicity) No Rank」については、C5 から C13 までの鎖長を持つ n-アルカノールは、同様の毒性作用を示す直接毒性物質である可能性があり、その代謝産物が親アルコールの毒性因子ではないと説明されていた。

### 2-2. 類似物質候補の検索

上記のプロファイラのうち、よりアルキル鎖の構造指定の範囲が広い「Long Chain Alcohols (C6-22 primary aliphatic alcohols) (less susceptible) No rank」を有する類似物質の情報を収集した結果、33 物質の情報が得られた。しかし、これら 33 物質のプロファイラを確認したところ、製品評価技術基盤機構 (NITE) が開発した有害性評価支援システム統合プラットフォーム (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform, HESS) による反復投与毒性に関するプロファイラに前項で示した 2 つのプロファイラ以外に適合する物質や CAS 番号がない物質が含まれていたため、これらを削除した結果、17 物質が抽出された。この 17 物質のうち、反復投与毒性、生殖発生毒性、発がん性いずれかの情報を有したのは、7 物質 (C9 のノナン-1-オールを含み C11 を除く C6~C13) であった。

一方、本物質は化学構造が単純であるため、プロファイラに関わらず、構造類似性に着目した類似物質候補検索も試みた。OECD QSAR Toolbox において本物質と  $\geq 90\%$  の構造類似性をもつ物質を検索した結果、C5~C12 の直鎖アルコールが抽出された。その他に、OECD SIDS (2006) による長鎖アルコールのカテゴリ-評価 (Long Chain Alcohols (C6-22 primary aliphatic alcohols)) を確認したところ、C16, 18, 22 の直鎖アルコールも評価対象としていた。

以上の検索結果から、本検討では、C5~22 の直鎖アルコールをノナン-1-オールの類似物質候補にすることとした (表 2)。なお、類似物質候補のうち、C10 のデカン-1-オール (CAS. 112-30-1) は、化審法の優先評価化学物質 (通し番号 170) として、生態影響を根拠に優先指定されている。人健康影響についてはスクリーニング評価の対象となっているが、未評価状態であった。したがって、本検討ではノナン-1-オールとデカン-1-オールの両方を類似物質候補の情報から RA により評価し、スクリーニング評価に供することが可能かを検討することとした。

### 2-3. 有害性情報等の収集・整理

ジイソブチル=ヘキサンジオアートでの検討と同様に、信頼性が担保された情報源を調査し、各毒性項目に関する情報を収集した。その結果、現時点までの調査においては、一般毒性は C5, 6, 7, 12, 16, 18, 22 に、生殖発生毒性は C7, 12, 18, 22 にスク評に資する情報を得た。遺伝毒性については、C5~C22 に関する Ames 試験及び *in vitro* 又は *in vivo* 染色体異常試験の情報を得た。現在、得られた有害性情報を表形式及びスクリーニング評価のための個別シートに整理している。現時点までの整理状況からは、C9 及び C10 の一般毒性及び生殖発生毒性については、より短鎖の直鎖アルコールの情報から内挿により RA 可能であることが見込まれている。

## D. 考察

### 1. ジイソブチル=ヘキサンジオアート

ジイソブチル=ヘキサンジオアートについては、プロファイリングによってアジピン酸骨格を有する物質に生殖発生毒性が確認されたため、OECD QSAR Toolbox を用いた類似物質候補の検索の第一段階では、アジピン酸骨格を有するすべての物質を抽出することとした。このように、最初に毒性プロファイルを確認することを類似物質候補検索の絞り込み条件にすることは、化学構造の類似性だけでなく毒性学的な根拠を持った類似物質候補の選別に有用であると考えられた。

本物質の類似物質候補検索では、OECD QSAR Toolbox に依存した方法を選択しているが、一般的に、*in silico* ツールには現存する情報がすべて収載されているわけではなく、場合によっては情報に誤りがある場合がある。そのため、*in silico* ツール（データベース含む）から得られた情報については、客観的に精査する必要がある。

有害性情報収集については、OECD QSAR Toolbox 以外のデータベース等からも情報を得ることとしたが、この方法は、OECD QSAR Toolbox から得られた化学物質やその構造や物理化学的性状、有害性情報の有無や精度を客観的に評価し、有用であれば利用する仕組みの基盤になると考えた。有害性情報収集・整理の結果、類似物質候補の一部について情報が得られた。また、各物質については、評価すべき毒性項目のすべてまたは一部に有害性情報があった。この様に、評価対象物質そのものに有害性情報がなく RA を試みる場合であっても、類似物質候補に有害性など必要な情報が十分にあるとは限らない。また、情報があったからと言って、評価に資する質を有するとは限らず、内容の精査が必要である。したがって、本物質について得られた情報について、現時点では一般毒性しか精査できていないが、今後は生殖発生毒性、発がん性、遺伝毒

性についても精査していく。

一般毒性については、得られた試験結果より、Diethylhexyl adipate は体重や肝重量に影響を及ぼすことが確認され、前述の他の類似物質候補 2 物質（1000 mg/kg/day の 28 日間投与で毒性影響なし）とは異なっていた。これは、投与期間の違いが原因である可能性があるが、現段階ではジイソブチル=ヘキサンジオアートの一般毒性を 3 つの類似物質候補の毒性情報から類推できるかは断定できない。

今後は、各類似物質候補の物理化学的性状や代謝物の毒性も含めて精査し、ジイソブチル=ヘキサンジオアートの一般毒性、生殖発生毒性、遺伝毒性、発がん性を類似物質候補の情報を活用して類推することが可能かをさらに検討していく。

### 2. ノナン-1-オール

ノナン-1-オールの類似物質候補検索については、プロファイリングによる検索方法だけではなく、化学構造のみに着目した検索方法及び既評価情報での評価対象物質を参照したことにより、類似物質候補の範囲を決定した。今回の 2 例のケーススタディから、類似物質候補の検索方法は、評価対象物質の構造や予測される毒性プロファイルにより、多角的に検索する必要があることが考えられた。C9, C10 について、現時点では、収集した有害性情報を整理するにとどまっているが、今後は得られた類似物質候補の有害性情報を精査し、物理化学的性状等も確認し、類似物質候補から外すべきものがないか、RA により C9, C10 のスクリーニング評価の可能性を検討する。

## E. 結論

2物質を対象としたRAのケーススタディにより、類似物質候補の検索方法や有害性情報の収集方法の検討、得られた情報の整理、有害性情報の精査を行った。現時点では、対象とした2物質がRAによりスクリーニング評価が可能になるか判断ができない



#### 別添 4

が、今後もこのケーススタディを継続し、類似物質候補に妥当性がありスクリーニング評価に資する評価案を提示できるかを検討する。また、この過程で、審議に資する評価資料の提示様式についても提案する。

特になし

#### **F. 研究発表**

##### F-1. 論文発表

特になし

##### F-2. 学会発表

特になし

#### **G. 知的所有権の取得状況**

##### G-1. 特許取得

該当なし

##### G-2. 実用新案登録

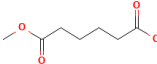
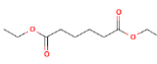
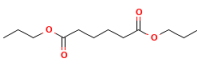
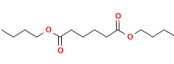
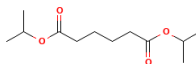
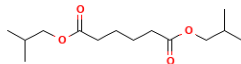
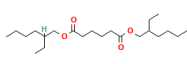
該当なし

##### G-3. その他

該当なし

#### **H. 引用文献**

表 1.類似物質候補

	Dimethyl adipate	Diethyl adipate	Dipropyl adipate	Dibutyl adipate	Diisopropyl adipate	<b>Diisobutyl adipate</b>	Diethylhexyl adipate
	類似物質候補	類似物質候補	類似物質候補	類似物質候補	類似物質候補	<b>調査対象物質</b>	類似物質候補
CAS No.	627-93-0	141-28-6	106-19-4	105-99-7	6938-94-9	141-04-8	103-23-1
構造式							
分子量	174.19 g/mol (PubChem (Access in Feb 2024))	202.25 g/mol (PubChem (Access in Feb 2024))	230.30 g/mol (PubChem (Access in Feb 2024))	258.35 g/mol (PubChem (Access in Feb 2024))	230.30 g/mol (PubChem (Access in Feb 2024))	258.35 g/mol (PubChem (Access in Feb 2024))	370.6 g/mol (PubChem (Access in Feb 2024))
物理化学 的性状	Physical Description: Liquid (20°C, 1013 hPa) Boiling Point: 230.9 °C (1 atm) Melting/freezing point: 9.1 °C (1 atm)	N. A	N. A	Physical Description: Liquid (20°C, 1013 hPa) Boiling Point: 165 °C at 10 mmHg Melting/freezing point: -32.4 °C Vapour pressure 0.021 Pa (25 °C)	Physical Description: Liquid (20°C, 1013 hPa) Boiling point: 291.9 °C (101,325 Pa) Melting/freezing point: -3 °C (101,325 Pa) Water Solubility: 180	N. A	Physical Description: Liquid (20°C, 1013 hPa) Boiling point: 377.88 °C (101,325 Pa) Melting / freezing point: -67.8 °C (101,325 Pa)

別添 4

	Dimethyl adipate	Diethyl adipate	Dipropyl adipate	Dibutyl adipate	Diisopropyl adipate	Diisobutyl adipate	Diethylhexyl adipate
	<p>Water Solubility: 4 g/L (20 °C) 注) RA による結果 Vapor Pressure: 2.84 Pa (21 °C) Log Pow = 1.4 (22 °C, pH 6.9) (ECHA (Access in Feb 2024))</p>			<p>Water solubility: 35 mg/L (25 °C)</p>	<p>mg/L (25 °C) Vapour pressure: 0.26 Pa (20 °C) Log Pow = 2.85 (room temperature) (ECHA (Access in Feb 2024))</p>		<p>Water solubility 0.003 mg/L (22 °C) Log Pow = 8.94 (25° C) (ECHA (Access in Feb 2024))</p>
反復投与毒性	<p>(参考) ラット 90 日間吸入暴露試験 (エアロゾル) 用量 : 400 mg/m<sup>3</sup> (1 用量)</p>	N. A	N. A	<p>ラット 28 日間強制経口投与試験 用量: 20, 140, 1000 mg/kg/day NOAEL = 1,000 mg/kg/day (厚労省既存化学物質毒性データベース (Access in</p>	<p>ラット 28 日間強制経口投与試験 用量: 1000 mg/kg/day NOAEL = 1,000 mg/kg/day (ECHA 登録情報 (Access in November 2023)</p>	N. A	<p>90 日間経口投与試験 (混餌) NOAEL = 用量: 詳細不明 影響: 体重増加抑制 189 mg/kg/day (ラット) NOAEL = 451</p>

別添 4

	Dimethyl adipate	Diethyl adipate	Dipropyl adipate	Dibutyl adipate	Diisopropyl adipate	Diisobutyl adipate	Diethylhexyl adipate
				November 2023))			mg/kg/day (マウス) (SIDS (2005))
生殖発生 毒性	腹腔内投与試験 (妊娠 5-15 日) 用量: 0.06、0.2、0.4、0.6 mg/kg/day 骨格奇形、肉眼的異常、内臓の奇形 (Singh et al. 1973)	腹腔内投与試験 (妊娠 5-15 日) 用量: 0.08、0.3、0.5、0.8 mg/kg/day 肉眼的異常、骨格奇形(Singh et al. 1973)	腹腔内投与試験 (妊娠 5-15 日) 用量: 0.1、0.4、0.8、1.3 mg/kg/day 肉眼的異常、骨格奇形 (Singh et al. 1973)	生殖毒性スクリーニング試験 用量: 0, 30, 100, 1,000 mg/kg/day NOAEL (親動物) = 300 mg/kg/day NOAEL (児動物) = 300 mg/kg/day NOAEL (生殖能) = 1,000 mg/kg/day (厚労省既存化学物質毒性データベース (Access in November 2023))  腹腔内投与試験 (妊娠 5-15 日) 用量 0.2、0.5、		腹腔内投与試験 (妊娠 5-15 日) 用量: 0.2、0.6、1.2、2.0 mg/kg/day 0.6 mg/kg/day 以上の投与群 : 骨格奇形、肉眼的異常 2.0 mg/kg/day 投与群 : 内臓の奇形 (Singh et al. 1973)	一世代生殖毒性試験 用量: 0、28、170、1,080 mg/kg/day 影響: 1,080 mg/kg/day で児動物の体重減少や同腹子の減少 NOAEL = 170 mg/kg/day (SIDS (2005))  発生毒性試験 用量 0、28、170、1,080 mg/kg/day 影響: 1,080 mg/kg/day で

別添 4

	Dimethyl adipate	Diethyl adipate	Dipropyl adipate	Dibutyl adipate	Diisopropyl adipate	Diisobutyl adipate	Diethylhexyl adipate
				1.0、1.7 mg/kg/day 肉眼的異常、骨格奇形、内臓の奇形 (Singh et al. 1973)			着床前胎児死亡 NOAEL = 170 mg/kg/day (SIDS (2005))  腹腔内投与試験 (妊娠 5-15 日) 用量: 1.0、5.0、10.0 mg/kg/day 肉眼的異常、骨格奇形、内臓の奇形 (Singh et al. 1973)
発がん性	N. A	N. A	N. A	N. A	N. A	N. A	ラット発がん性試験 (103 週間混餌) 用量 0、600、1,250 mg/kg/day 腫瘍発生なし (NTP-TR, 1982)  マウス発がん性試

別添 4

	Dimethyl adipate	Diethyl adipate	Dipropyl adipate	Dibutyl adipate	Diisopropyl adipate	<b>Diisobutyl adipate</b>	Diethylhexyl adipate
							験 (103 週間混餌) 用量: 0、1,800、 3,750 mg/kg/day 肝細胞がん、肝細胞 腺腫 (NTP-TR, 1982)

別添 4

表 2. ノナン-1-オールの類似物質候補と有害性情報の有無

Primary Alcohol (炭素鎖長)	CAS	物質名	一般毒性	生殖発生毒性	遺伝毒性					発がん性
					Ames試験	in vitro 染色体異常 試験	その他の in vitro 試験	in vivo 小核試験	その他の in vivo試験	
C5	71-41-0	1-pentanol	○	△	○	○	○	×	×	×
C6	111-27-3	1-hexanol	○	△	○	×	×	×	×	×
C7	111-70-6	1-heptanol	○	○	○	○	○	×	×	×
C8	111-87-5	1-octanol	×	△	○	×	×	×	×	×
<b>C9</b>	<b>143-08-8</b>	<b>1-nonanol</b>	×	×	×	×	×	×	×	×
<b>C10</b>	<b>112-30-1</b>	<b>1-decanol</b>	×	×	○	×	×	×	×	×
C11	112-42-5	1-undecanol	×	×	×	×	×	×	×	×
C12	112-53-8	1-dodecanol	○	○	○	×	×	○	×	×
C13	112-70-9	1-tridecanol	×	×	○	×	×	×	×	×
C14	112-72-1	1-tetradecanol	×	×	○	×	×	×	×	×
C15	629-76-5	1-pentadecanol	×	×	×	×	×	×	×	×
C16	36653-82-4	1-hexadecanol	○	×	○	×	×	×	×	×
C18	112-92-5	1-octadecanol	○	○	○	×	×	○	×	×
C20	629-96-9	1-eicosanol	×	×	×	×	×	×	×	×
C22	661-19-8	1-docosanol	○	○	○	○	○	○	×	×

○：有害性情報あり、△：有害性情報があるが参考扱い、×：情報なし

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）  
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

分担研究課題名: Data Independent Acquisition法による遺伝毒性プロテオミ  
クスの基礎的背景データの取得

分担研究者 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

分担研究者 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

*In vitro* 遺伝毒性試験データから発がん性の定量的予測の具体化が求められており、哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝毒性試験による新技術のうち、有効なアプローチとしてトキシコプロテオミクスが挙げられる。それは、得られた遺伝毒性試験データの解釈が困難な場合、トキシコプロテオミクス統合型 *in vitro* 遺伝毒性試験によって、Weight of Evidence アプローチにおいて重要な役割を果たす可能性がある。本研究では、プロテオミクスデータとエンリッチメント解析の結果が、細胞内の生命活動を正確に反映しているかを調べることを目的として、Data Independent Acquisition (DIA) によるノンラベル化法を用いるトキシコプロテオミクスを遺伝毒性試験のなかで実施した。従来法と比較して、DIA 法は 6000 を超えるタンパク質数を同定・定量できるため、エンリッチメント解析を信頼性あるツールとして利用可能ではないかと考えられる。本期間中では、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。現段階において、まだ実験データが十分ではないが、昨年度実験した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理細胞では、容易に DNA 修復や DNA 損傷ストレス GO が観察された。それは、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、未処理細胞ではそうでなかった（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。

キーワード：TK6 細胞、トキシコプロテオミクス、Data Independent Acquisition

A. 研究目的

*In vitro* 実験において、発がん性物質の処理細胞と未処理細胞は、顕微鏡視野であっても一見して区別しにくい、それらの細胞内の生命活動は極めて異なる。もし、これらの両細胞をプロテオミクスした結果が、その状況通りに、前者の細胞では生命を維持するため DNA 修復等の生体防御反応が、

後者の細胞では平然とした細胞増殖等が、主な生命活動として我々に教えてくれるとすれば、それは非常に興味深い。本研究は、発がん性遺伝毒性物質の定量的評価、および遺伝毒性試験で解釈の難しい化学物質に対して、細胞にどのような毒性機序が起きているのかを問いかけることができるなど、非常に有用性の高い技術になりうると考え



られる。

我々は、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 (BER) 等の DNA 修復機構を促進させる遺伝毒性スキームが存在することを知っている。本研究は、DIA 法による 6000 を超えるタンパク質群を同定・定量し、細胞の生命活動をエンリッチメント解析によって容易に把握できるかを調査する。

昨年度の前備実験において、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 修復等のジノントロジー (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。なお、GO とは (実験医学増刊 Vol.29 No.20 (2011))、遺伝子の属性を記述する語彙を統一化し、種を越えた遺伝子関連情報を記述し構造化することを目的とした国際プロジェクトであり、すべての語彙は、biological process (生物学的プロセス)、cellular component (細胞の構成要素)、molecular function (分子機能) の 3 カテゴリーのいずれかに属し、語彙と語彙の上下関係が一義に決まっているのでコンピュータにとって利用しやすい (参照 URL: <http://www.geneontology.org/>)。

## B. 研究方法

### 1. 細胞培養および処理方法

ヒトリンパ芽球細胞 TK6 株は、10%馬血清 (JRH Bioscience), 200 µg/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 µg/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% CO<sub>2</sub> 濃度存在下で行った。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ー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 10<sup>5</sup> cells) を液体窒素で急冷、保存した。

### 2. プロテオミクスの実験デザイン、および使用した装置と解析ソフト

将来的に、遺伝毒性試験に組み込むことを見据えて、プロテオミクスやエンリッチメント解析等の方法は、比較的誰でも簡単にできるプロトコールを採用した。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。また、エンリッチメント解析については、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。詳細な前処理方法や解析方法の条件は、現段階においてコンフィデンシャルとするが、以下に簡易なプロトコール概要を示した。

### 3. プロテオミクスプロトコール

#### 3-1) 細胞溶解液の調製

細胞培養ディッシュに培養した細胞を、冷 PBS にて洗浄し、Minute™ Total Extraction Kit の Lysis buffer 200 µL を添加し、氷上で 3 分間放置し細胞を溶解させた。細胞溶解液をピペットチップにて protein extraction filter cartridge に移し、

#### 別添 4

14,000 rpm、30 秒遠心分離し、コレクションチューブに溶解液を集めた。

#### 3-2) タンパク質の沈殿と可溶化

細胞溶解液に 4 倍量のアセトンを加え、タンパク質を沈殿させ、14,000 x g にて 15 分間遠心分離後、上清を除き、沈殿を 100  $\mu$ L の 0.1% Rapigest (Waters) に溶解させた。Qubit spectrometer (Invitrogen) にてタンパク質濃度を測定した後、タンパク質 12  $\mu$ g 相当量を取り、再び 0.1% Rapigest にて希釈し全量を 24  $\mu$ L にした。

#### 3-3) 還元アルキル化

タンパク質画分の調製後、トリプシンによる消化を促進するために、タンパク質 S-S 結合の還元とアルキル化の処理を行なった。タンパク質溶液 20  $\mu$ L に、1  $\mu$ L の 105 mM DTT (dithiothreitol) を加え、60  $^{\circ}$ C、30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、1  $\mu$ L の 330 mM ヨードアセトアミド溶液を加え、遮光して室温にて 30 分間反応させた。

#### 3-4) トリプシン消化

還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液 (Trypsin Gold, Promega) を 1  $\mu$ L (0.25  $\mu$ g/ $\mu$ L) 加え、37  $^{\circ}$ C で 24 時間消化した。消化液を、ZipTip C18-P10 (Millipore) にて精製後、LC-MS 解析に用いた。

#### 4. LC-MS 解析

PAL HTS-xt オートサンプラーにて試料を導入し、配管には内径 50  $\mu$ m のヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18 逆相カラム (CERI, L-column2 ODS) を使用した。移動相は A (水 0.1% ギ酸)、B (アセトニトリル) の 2 種類の組成の溶媒を用い、B; 2% から B; 98% へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた。

MS 解析について、通常の測定は、ポジ

ティブモードを使用した。逆相 C-18 カラム (CERI 製 0.1 mm x 150 mm) にてペプチドを分離後、ナノスプレーインターフェース (Dream Spray, AMR) にて質量分析装置へと導入した。質量分析装置の設定に関しては、基本的に以下の項目に関して最適な MS 測定条件を検討し、使用した。

・使用した MS: Q Exactive (Thermo Fisher Scientific)

・イオン化法: ESI ポジティブモード

・測定時間: 130 分 (グラジエント時間 12~130 分を測定)

・MS 分析の種類: Overlapping window DIA

・イベント 1 と 3 のフルスキャン (MS1) 測定のパラメーター

Resolution: 17,500

AGC target: 3e6

Maximum IT: 60 ms

Scan range: 495 to 745 m/z

・イベント 2 と 4 の DIA (MS2) 測定パラメーター

Resolution: 35,000

AGC target: 3e6

Maximum IT: auto

Loop count: 61

Normalized Collision Energy: 22, 26, 30

Isolation window: 4.0 m/z

Isolation window center m/z:

Confidential

#### 5. タンパク質の同定と定量、およびエンリッチメント解析方法

タンパク質・ペプチドの同定、並びに定量値の算出をするために、MS データは Scaffold DIA ソフトウェアを用いて以下の条件でデータを取得した。タンパク質同定は、培養開始 0 時間の細胞と数時間後にサンプリングされた未処理細胞、および培養開始 0 時間と数時間後にサンプリングされたマンニトール処理細胞の DIA MS データを Scaffold DIA ソフトウェアで解析した。統計処理は、ソフトウェア上の t-test ある

いは Anova (有意水準 ;  $p < 0.05$ ) で行われた。培養開始 (0 時間) の細胞に対して、サンプリングされた細胞で、統計的に有意差のあったタンパク質 (Statistically significantly increased and decreased proteins (SSPs)) を抽出した。有意に増減したタンパク質群 SSPs は、Excel ファイルにエクスポートし、Metascape ウェブサイト

(<https://metascape.org/>) を用いてエンリッチメント解析を実施した。そのエンリッチメント解析の方法は、そのウェブサイトの仕様に従って行った。本研究では、DNA 修復、および DNA 損傷の応答に関する GO に焦点を当ててエンリッチメント解析を行った。

・ 使用したソフトウェア: Scaffold DIA (Proteome Software)  
 Protein Sequence Database : Human UniProtKB/Swiss-Prot database  
 Spectral Library : HumannyPrositLib.dlib, Prosit (<https://www.proteomicsdb.org/prosit/>)  
 Fragmentation: HCD  
 Precursor Tolerance: 9 ppm  
 Fragment Tolerance: 9 ppm  
 Data Acquisition Type: Staggered DIA  
 Digestion Enzyme: Trypsin  
 Peptide Charge: 2-4  
 Max Missed Cleavages: 1  
 Fixed Modification: Carbamidomethylation [C]  
 Peptide FDR: 1%以下  
 Protein FDR: 1%以下

## C. 研究結果、および考察

### 1. 未処理実験

5%あるいは10%馬血清を含む二種類の培地を使って、培養開始時 (0 時間) の細胞、1.5 と 3 時間後の TK6 細胞をサンプリングし、タンパク質同定は、それらサンプリングされた細胞の DIA MS データを Scaffold DIA ソフトウェアで解析した。Table 1 に示した通り、すべての実験でタンパク質同定数は 6000 を超えた。ソフトウ

ェア上で統計解析した結果、各実験ごとに 333 個以上の SSPs を抽出することができた。それらを Metascape ウェブサイトでエンリッチメント解析したところ、5%馬血清を使用し、3 時間後にサンプリングした細胞のプロテオミクスデータ以外は、本研究で焦点としている GO (DNA 修復、および DNA 損傷応答に関連) は観察されなかった (Table 1)。このことから、10%馬血清を含有する培地を用いると良いことが分かった。

### 2. マンニトール処理実験

哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験のプロトコール (OECD ガイドライン) に従って、非代謝活性化条件下によるマンニトールの用量設定試験を行った結果、最高用量の 1822  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (10 mM) でも細胞毒性は観察されなかった (Figure 1)。

マンニトール処理実験は、マンニトール処理群と未処理群を用意し、培養開始時 (0 時間) の細胞、および 1822  $\mu\text{g}/\text{mL}$  マンニトール連続処理群と未処理群の細胞を、それぞれ 0.5、4、24 時間後にサンプリングした。Table 2 に示した通り、すべての実験でタンパク質同定数は 6000 を超えた。Scaffold DIA ソフトウェア上で統計解析した結果、各実験ごとに 772 個以上の SSPs を抽出することができた。それらを Metascape ウェブサイトでエンリッチメント解析したところ、マンニトールの未処理群 (0.5 時間) およびマンニトール処理群 (24 時間) 以外の実験では、本研究で焦点としている DNA 修復、および DNA 損傷応答に関連する GO は観察されなかった (Table 2)。未処理群 0.5 時間の実験では、ヌクレオチド除去修復と DNA 複製がノード接続されたが、それは主となる生命活動を示す中央クラスターとはノード接続されず、マイナーな活動であることが示唆された (Figure 2)。また、マンニトール処理 24 時間の実験は、Homologous Recombination (相同組換え) の GO が観察されたが、中央クラスターとノード接続さ

## 別添 4

れることはなく、マイナーな活動であると思われた (Figure 3)。つまり、遺伝毒性を有さないマンニトール処理をしても、DNA 修復、および DNA 損傷応答に関連する GO は主たる生命活動のなかに観察されなかった。このことは、本研究で構築した DIA 法によるプロテオミクスとエンリッチメント解析は、変異原性物質等の未処理細胞の生命活動をほぼ正しく反映していると考えられた。

昨年度実施した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 mismatches 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。

昨年度に判明したコントロールの未処理細胞にも関わらず、まれに DNA 修復等の GO が観察されることがあった問題点に対して、本年度の研究によって、それは解決したと考えられる。その他、昨年度に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、いくつかの問題点を見つけたが、それらの解決には非常に時間を要すると考えられる。効率良く解決できる方策としては、KEGG データベースを遺伝毒性用に最適化することが重要と思われる。

## D. 結論

現段階において、まだ実験データが十分ではないが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。

## E. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

- 1) 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, 安井学, 鶴飼明子, 澁谷真也, 本間正充, 杉山圭一, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会, 福岡市(2023.11.11)
- 2) 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, 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, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会, 福岡市 (2023.11.12)
- 3) 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, 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, 第 46 回日本分子生物学会年会, 神戸市 (2023.12.6)

## F. 知的所有権の取得状況

### F-1. 特許取得

該当なし

別添 4

F-2. 実用新案登録

該当なし

F-3. その他

該当なし

別添 4

Table 1. 各培地で1.5および3時間培養したTK6細胞のDIA法によるタンパク質同定数

	1.5時間			3時間		
	1回目	2回目	3回目	1回目	2回目	3回目
10%馬血清培地	6060	6104	6097	6056	6201	6097
SSPs <sup>*1</sup>	428	573	1376	700	728	1362
エンリッチメント解析結果	問題なし <sup>*2</sup>	問題なし	問題なし	問題なし	問題なし	問題なし
5%馬血清培地	6394	6258	6389	6390	6260	6385
SSPs	466	573	435	768	333	849
エンリッチメント解析結果	問題なし	問題なし	問題なし	DNA repair <sup>*3</sup>	問題なし	問題なし

\*1; SSPs, Statistically significantly increased and decreased proteins

\*2; 問題なしは、DNA修復、およびDNA損傷応答に関連するGOが無かったことを示す

\*3; 塩基除去修復およびヌクレオチド除去修復などのGOが観察され、中央クラスターGOとノード接続があった

Table 2. マンニトール処理されたTK6細胞のDIA法によるタンパク質同定数

	0.5時間	4時間	24時間
マンニトール処理群	6263	6057	6491
SSPs	772	1252	899
エンリッチメント解析結果	問題なし	問題なし	DNA repair <sup>*1</sup>
未処理群	6263	6057	6491
SSPs	805	1286	977
エンリッチメント解析結果	DNA repair <sup>*2</sup>	問題なし	問題なし

\*1; 相同組み換え修復のGOが観察されたが、中央クラスターGOとのノード接続無し

\*2; ヌクレオチド除去修復のGOが観察されたが、中央クラスターGOとのノード接続無し

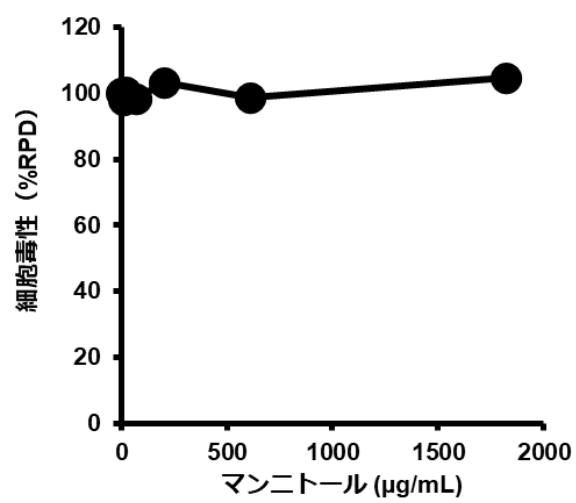


Fig. 1. TK6細胞を用いるマンニトールに対する細胞毒性試験

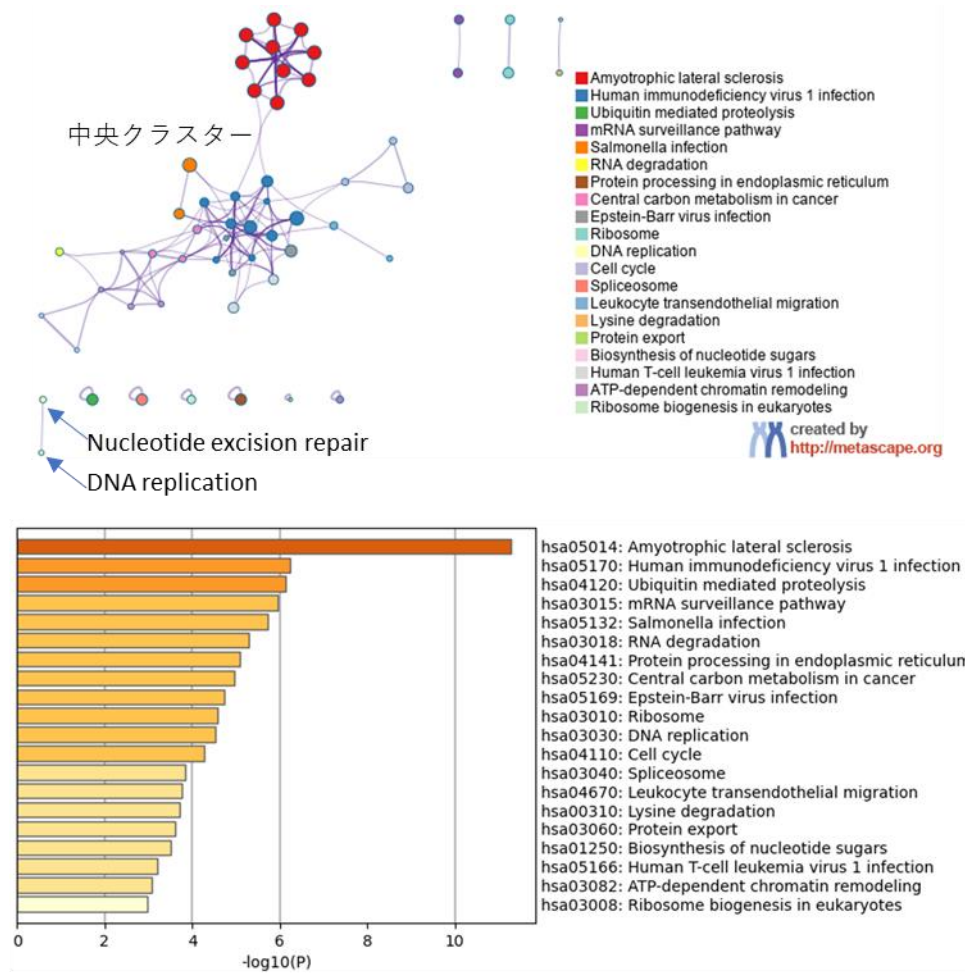


Fig. 2. 未処理群0.5時間後（マンニトール処理実験のコントロール群）のエンリッチメント解析結果（Top 20）



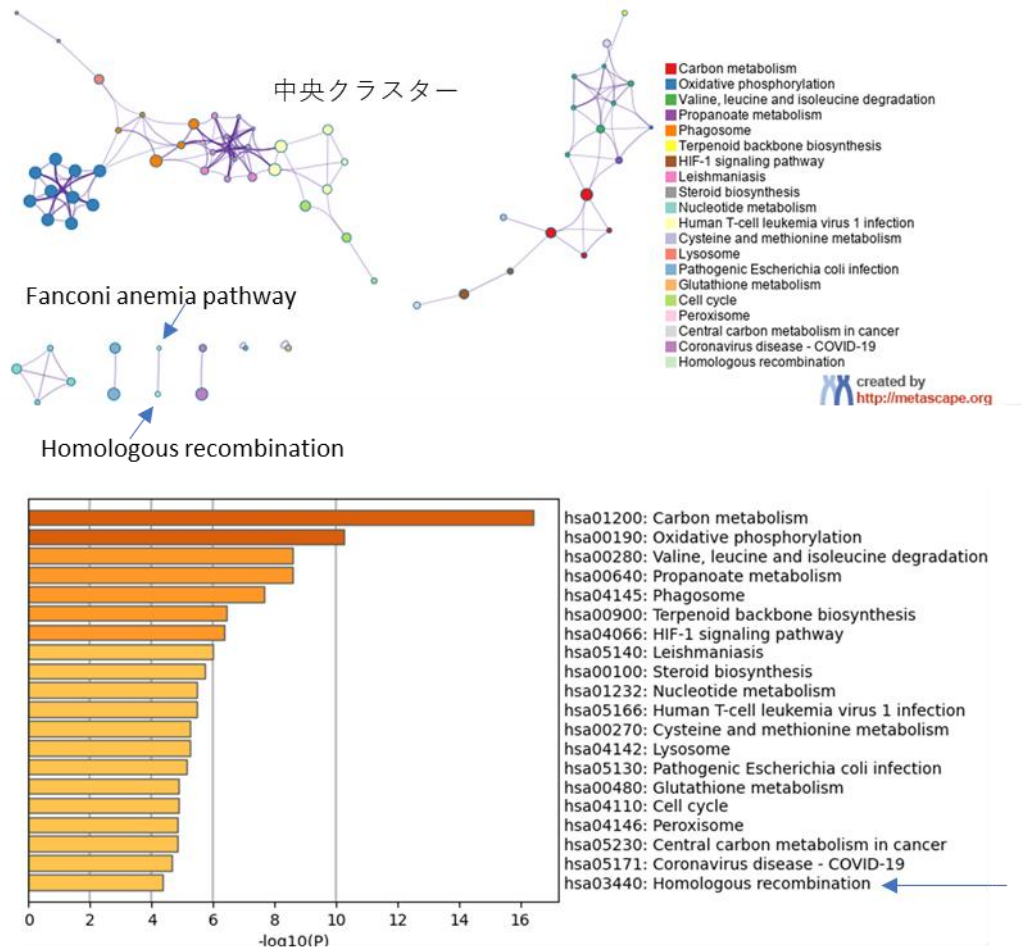


Fig. 3. マンニトール処理24時間後のエンリッチメント解析結果 (Top 20)

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）  
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

分担研究課題名：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

研究分担者 堀端 克良 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究分担者 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**

化学物質等の遺伝毒性評価結果はその発がん性を評価する上で非常に重要な指標であるが、現在確立されている遺伝毒性の研究手法では、遺伝毒性と発がん性の定量定性的な相関解析は困難である。その原因として、遺伝毒性評価法と発がん性評価法におけるそれぞれの手法やエンドポイントの相違等が挙げられる。言い換えれば、遺伝毒性評価と発がん性評価を同じ研究材料・試験系等を用いてそれぞれを解析することにより相互の定量定性的な相関解析が実施可能な試験系を確立することで、遺伝毒性の定量定性評価から発がん性を定量定性的に予測するための研究基盤とすることができる。そこで、発がん性試験を含む毒性試験等から得られる組織標本を用いた定量定性的な遺伝毒性評価法の技術基盤を整備するため、クロマチン免疫沈降法（**Chromatin immunoprecipitation; ChIP**）を利用した遺伝毒性応答反応解析系に着目し、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を明らかにした。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。

**A. 研究目的**

化学物質等の遺伝毒性評価結果はその発がん性を評価する上で非常に重要な指標である。一方で、現在確立されている遺伝毒性の研究手法では、どの程度の遺伝毒性がどの程度発がん性に関与するのかといった、遺伝毒性と発がん性の定量定性的な相関解析は困難である。その原因として、既存の遺伝毒性評価は定性的であることに加え、遺伝毒性評価法と発がん性評価法におけるそれぞれの研究材料、手法、およびエンドポイントの相違等により相互の相関解析が困難であること等が挙げられる。これを言い換えれば、遺伝毒性評価と発がん性評価を同じ研究材料・試験系等を用いて解析し、相互

の定量定性的な相関解析を実施可能な試験系を確立することで、遺伝毒性定量定性評価から発がん性を定量定性的に予測するための研究基盤とすることができる。すなわち、発がん性試験を含む毒性試験等から得られた組織標本を用いて定量定性的な遺伝毒性評価を実施することができれば、遺伝毒性および発がん性評価の相関解析は容易になると期待できる。しかし、実際の発がん性試験や関連する毒性試験等の組織標本は通常ホルマリン等で固定されていること、また、試験条件も従来の遺伝毒性試験とは異なるため、これらの標本を用いて従来の研究手法により遺伝毒性を評価するのは現状では極めて困難である。

近年発展した分子生物学的研究手法であるクロマチン免疫沈降法 (**Chromatin immunoprecipitation; ChIP**) は、DNA上で生じているタンパク質の諸反応を直接的に定量定性解析する研究手法である。一般的なChIPでは、培養細胞を用いて、解析したい任意の時点でホルムアルデヒド処理によりDNA-タンパク質間をクロスリンク (架橋) させ、従来は解析困難であったDNA-タンパク質結合画分を超音波処理または酵素学的処理で再可溶化し、免疫沈降法、脱クロスリンク法および定量的PCR法によりDNA-タンパク質間の諸反応を定量定性解析する (図1)。この手法を応用した定量定性的なDNA損傷応答解析による遺伝毒性評価手法の高い潜在性が最近示されている。その一方で、現状でのChIPにおけるホルムアルデヒド処理条件は動物組織固定のホルマリン固定条件と比べてやや軽度 (低濃度) である場合が多いなど、ChIPは分子生物学的な基礎研究に特化した研究手法が確立されているのみであり、遺伝毒性評価のための十分な研究解析や検証がなされていない。

以上を踏まえ、究極的には遺伝毒性および発がん性評価における研究材料・試験系等の統合を見据えた相互の定量定性的な相関評価研究手法を開発することを目指し、そのための基盤研究としてChIPを応用した *in vitro/ in vivo* 遺伝毒性解析手法の固定化動物組織標本への適用性の検証を含めた研究技術基盤を整備することを本研究の目的とする。

## B. 研究方法

これまでの別研究により、紫外線によるDNA損傷応答反応をChIP法で検出することができることが明らかとなっている。紫外線DNA損傷は比較大きなDNA損傷であるが、その一方で、例えばアルキル化剤によるDNA損傷のように比較的小さなDNA損傷によるDNA損傷応答反応をChIP法で検出することができるかどうかは不明である。そこで、化学物質、特にアルキル化剤によるDNA

損傷応答反応を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*-entyl *N*-nitrosorea (ENU)を6 µg/mLまたは12 µg/mLの濃度で3時間処理し、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。同時に、DNA損傷の種類の違いによる差を検証するため、293細胞に紫外線 (UV-C、10 J/m<sup>2</sup>) を照射し、同様の解析を実施した。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ENU処理後における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DNA損傷応答反応を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 (図2)。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、昨年度の検証結果で得られた超音波処理条件を基にした条件設定によりDNAを切断した後、それぞ

れを精製してアガロー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。

#### (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

ENUによるDNA損傷を293細胞に誘導後、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(図3A)。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。紫外線DNA損傷については、紫外線照射によるAPE1のrDNAへの結合量の変化や、rDNA unit上での局在変化は見られなかった(図3B)。

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(図3C)。

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でもほとんど検出しなかった。

### D. 考察

今回の結果では、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。加えて、APE1が紫外線DNA損傷の修復には寄与しないことが知られており、今回の結果では紫外線DNA損傷を誘導した場合においてはAPE1のrDNAへの結合量に変化がないことから、本試験系のDNA損傷の種類に対する特異性が示された。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。

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の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。

#### E. 結論

塩基除去修復機構で重要な役割を果たすAPEI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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### G.1. 論文発表

1. Murata Y, Natsume M, Iso T, 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
2. 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

3. 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, 2024
4. 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
5. 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

##### G.2 学会発表

1. Beal BA, Chen G, Dearfield KL, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Long AS, Lovell D, Parsons BL, Pfuhrer 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)

#### 別添 4

2. 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)
  3. 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)
  4. 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)
  5. 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)
  6. 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)
  7. 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)
  8. 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)
  9. 佐々木沙耶, 杉山圭一, 堀端克良. クロマチン分画上の 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)
  10. グルーズピーター, 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)
  11. 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/pKM101 vs WP2uvrA. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023.11.12. 福岡)
  12. 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)
- 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

### ChIP assayを利用したDNA損傷応答の検出

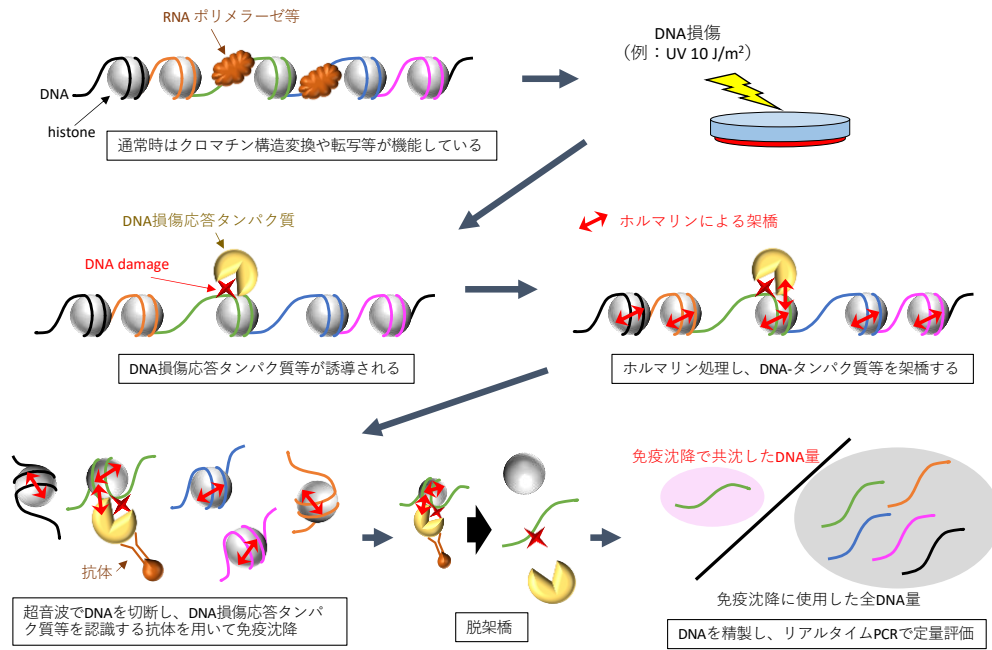


図1. ChIP assayを利用したDNA損傷応答の検出

			Day 0	Day 1	Day 2	Day 3 採材	endpoints
C57BL/6NCrSlc 3 animals/group	PBS		血液	IP	IP	血液 肝臓	ChIP 肝小核 末梢血小核
	ENU	100 mg/kg					
		50 mg/kg					
		25 mg/kg					
	EMS	200 mg/kg					
		100 mg/kg					
		50 mg/kg					
	2-AAF	200 mg/kg					
		100 mg/kg					
		50 mg/kg					
							ELISA ?

図2. 組織標本作成のための投与プロトコルとエンドポイント



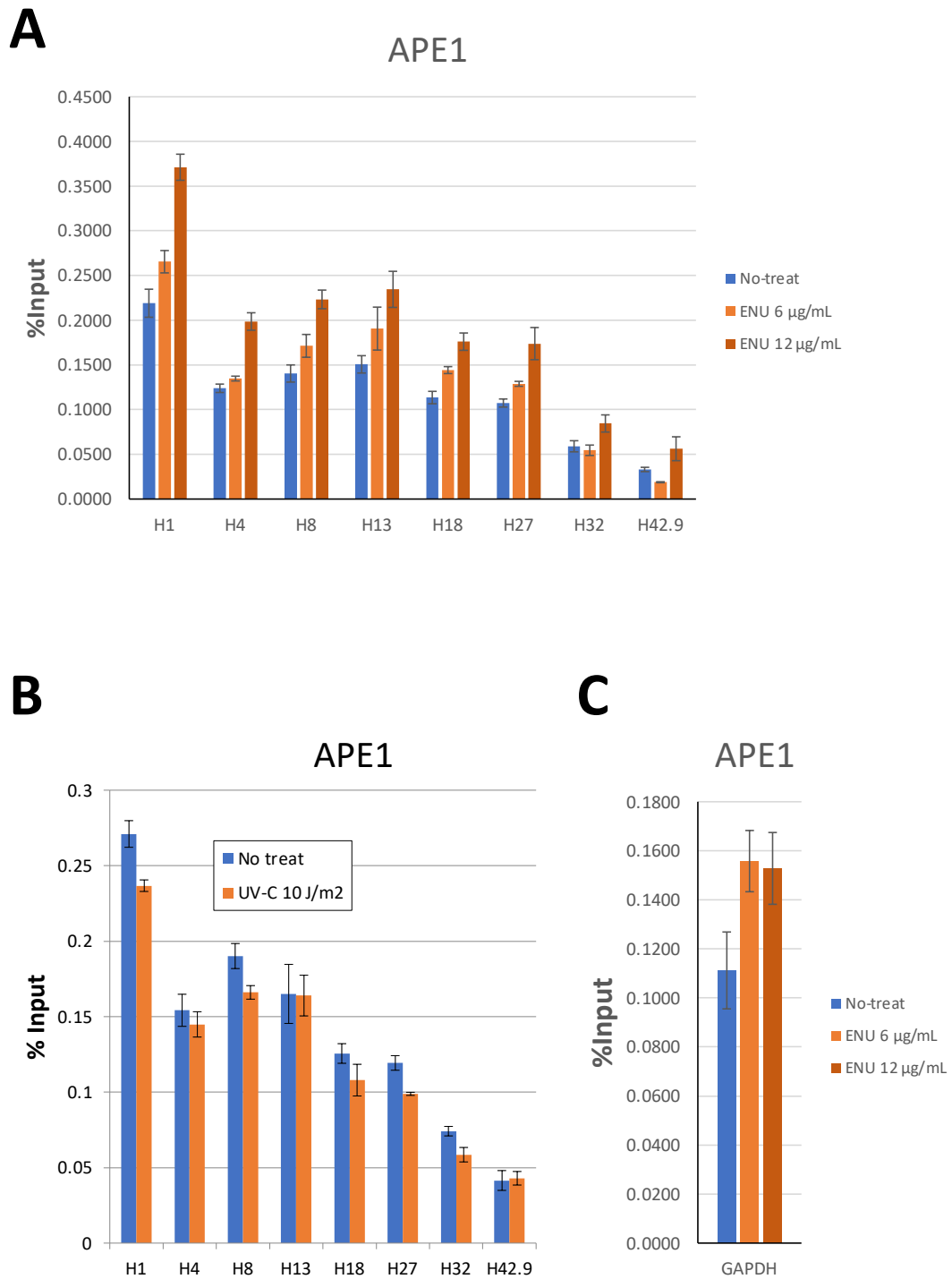


図3. 抗APE1抗体を用いたクロマチン免疫沈降法によるDNA損傷応答

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）  
 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

分担報告書名: 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

研究分担者 津田雅貴 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部  
 研究分担者 伊澤和輝 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部  
 研究分担者 鈴木孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部  
 研究分担者 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

化学物質の発がん性予測の場面において、変異原性は重要な指標となる。これまでの変異原性評価、特に*in vivo*の評価においては、レポーター遺伝子を導入したげっ歯類（Transgenic Rodent: TGR）を用いた試験が利用されてきた。しかしながらTGR試験においては、レポーター遺伝子における変異がゲノム全体における変異を反映しているか不明であることや、TGRという特殊な動物でのみ試験可能なこと、及び動物実験削減の世界的潮流から改良が期待される試験となっている。近年、TGR試験を代替し、より精緻な変異原性評価が可能な手法として次世代シーケンサー（NGS）のエラーを低減し、低頻度の変異を検出可能とするerror-corrected sequencing (ecNGS)法が世界的に注目されている。ecNGSを用いた手法においては、原理的にゲノム全体の変異を検出することが可能である。加えて、レポーター遺伝子など特定の遺伝子に限定されない変異原性評価法であるため、TGRを用いる必要がない。これらの利点は既存の発がん性試験や反復投与試験のサンプルから変異原性評価が可能になり、動物試験の削減につながることを期待され、既にガイドライン化に向けた国際的な議論が開始されている。

本分担研究においては、ecNGSを用いた発がん性予測手法の開発を目標として、まずecNGS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う。またecNGSを用いた変異原性評価手法の基盤技術の検討・開発のため、化学物質投与/非投与群の各種サンプルからNGSによるDNA配列情報取得とデータ解析を試みる。本年度においては、過去のTGR試験サンプルからのecNGSによるDNA配列情報の取得を試みた。また、TGR試験サンプルにおいては、ecNGSを用いた変異原性評価において、先行例が少なかったラットサンプルを用いることとし、本事業の分担者である石井雄二氏から過去のTGR試験サンプルを供与いただいた。手法検討の結果、現時点で本研究分担者らの環境において直ちに利用可能な手法はPECC-Seq法であることが判明した。そこで、ラットサンプルからDNAを抽出し、PECC-Seq法に従ったライブラリを作成、NGSによる解析を行った。その結果、NGSを用いた手法は過去のTGR試験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す他、発がん性予測手法の基盤技術となり得ることを示す。

## A. 研究目的

化学物質の発がん性予測の場面において、変異原性は一つの指標となるが、*in vivo*変異原性評価手法であるTGR試験においては課題が多い。一方で近年、TGR試験を代替し、より精緻な変異原性評価が可能な手法として次世代シーケンサー (NGS) を用いた手法が世界的に注目されている。本分担研究においては、NGSを用いた発がん性予測手法の開発を目標として、まず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う。またNGSを用いた変異原性評価手法の基盤技術の検討・開発のため、化学物質投与/非投与群の各種サンプルからNGSによるDNA配列情報取得とデータ解析を試みる。

本年度においては、過去のTGR試験サンプル、特にNGS手法における先行研究例の少ないラット試料から、NGSによるDNA配列情報の取得を試みた。またNGSにより得られたデータについて、いくつかの解析手法の検討を開始した。

## B. 研究方法

(ラットサンプルを用いた検討)

過去の TGR 試験 (Takasu et al., 2023) において得られていた薬剤投与群・非投与群から3個体ずつのラット (F344/Nslc gpt delta、雄) 由来の肝臓片サンプルを国立医薬品食品衛生研究所 病理部 石井雄二氏から供与いただいた。薬剤投与群においては、ジエチルニトロソアミン (DEN) を 40 mg/kg body weight の用量で5週間腹腔内投与されている。ラット肝臓片サンプルから DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN, Venlo, Nederland)を用いてゲノム DNA を抽出した。

PECC-Seq 法 (You et al., 2020) に従ってゲノム DNA を超音波破碎した後、S1 nuclease (Thermo Scientific™, MA, USA) 処理を行った。約 150bp の DNA 断片について TruSeq DNA PCR-Free Kit (Illumina, Inc., CA, USA)を用いて illumina 社シーケンサー用のライブラリを作製した。

ライブラリのシーケンスには、Illumina

NextSeq 2000 (Illumina, Inc., CA, USA) を用い、シーケンス試薬としては NextSeq 1000/2000 P2 (300 cycle) または P3 (300 cycle)試薬を用いた。

得られたリードデータについて、アダプター配列を Trimmomatic (v0.39) を用いて除去した。その後、公開されている F344/NHsd ラットのゲノム配列 (Guo et al., 2013) に対し、Burrows-Wheeler aligner (BWA) の *bwa mem* モードによってリードのマッピングを行った。マッピングデータを SAMtools (v1.9)によってソートし、適切にペアエンドのリードがマッピングされており、かつマッピングのクオリティが 60 以上であるリードを抜き出した。計算資源の制限から、以後の解析に用いるデータのうち、リードがマッピングされた位置から 10%程度の位置をランダムに抽出した。その後、4本のリードのみが同じ位置に適切な方向でマッピングされているリードのグループを抽出し、これらのリードが示す変異を抽出した。

抽出した薬剤誘導変異候補のうち、ラットの系統特異的な SNP を除外するため、全てのリードから計算された SNP を薬剤誘導変異候補から除いた。最後に、残りの薬剤誘導変異候補を IGV browser を用いて確認・フィルターした。フィルターの条件として、変異候補位置にマップされたリードが 30 本以上 100 本以下であること、変異候補を持つリードに 2 つ以上の候補がないこと、グループ外のリードが変異候補の変異を持たないことを条件とした。

(ヒト TK6 サンプルを用いた検討)

既存の培養細胞 TK6 由来の DNA サンプルを用いて PECC-Seq 法を行い、ecNGS 法における残存エラーの要因に関して検討を行った。

また、文献調査により他の ecNGS 法において S1 ヌクレアーゼ処理がエラー低減に有効だという報告があったため、PECC-Seq 法においても同様の効果があるかを確認した。ライブラリー調製において、断片化した

DNA の末端修復の際に S1 ヌクレアーゼ (Thermo Fisher, MA, USA) を 30unit/reaction 共存させ、30 °C、30 分反応させた。

### C. 結果及び考察

#### C-1. 既存手法と NGS 手法による変異頻度比較

PECC-Seq 法を用いた NGS 解析による結果の概略を表 1 に示す。PECC-Seq 法により、非投与群において平均  $1.00 \times 10^{-6}$ 、DEN 投与群において平均  $6.56 \times 10^{-6}$  の頻度で変異が見られた。この二群間における変異頻度の差には統計的に有意であった ( $p < 0.05$ )。この結果から、PECC-Seq 法は DEN が誘発した変異を検出することに成功していると考えられた。また既存手法である *gpt* アッセイにおいては変動係数が非投与群において 0.60、DEN 投与群において 0.45 であり、PECC-Seq 法においては非投与群において 0.53、DEN 投与群において 0.10 であった。変動係数は各手法・各群における変異体・変異頻度の変動幅を示すが、PECC-Seq による手法が既存手法よりもサンプル間における変動幅の少ない手法であることが示された。一方で、PECC-Seq 法においても非投与群においては変動幅が大きいことや、既存手法における DEN 投与群の変異頻度上昇率 (平均約 143 倍) に比べ PECC-Seq 法では上昇率が低い (平均約 6.5 倍) ことから PECC-Seq 法の感度には未だ改善の余地があることが示唆された。改善すべき点として、現状ではラットサンプルにおける実施例が少ないため、参照配列に対するラット特有の SNP を完全に除けていないことが考えられる。

*gpt* アッセイと PECC-Seq 法の変異頻度を比較した結果を図 1 に示す。両者が示した変異体・変異頻度は相関が高かった ( $R^2 = 0.89$ )。二つの手法は原理的に異なる技術でありながら強い相関を示したことから、PECC-Seq 法 (NGS 手法) が既存手法の代替法として有用であることが示唆された。

#### C-2. NGS 手法から得られる変異スペクトル解析結果

NGS 手法においては変異頻度のみならず、変異塩基のプロファイルまでもが一度の解析から得られることも既存手法と比べた場合の利点である。PECC-Seq 法においても変異塩基のプロファイルが得られ、その結果を図 2 に示す。各群において同様の変異スペクトルが得られており、PECC-Seq 法による結果の頑健性がここからも示された。

各変異スペクトルについて、DEN 投与群から得られた変異頻度が非投与群に対して何倍変化しているかをグラフにしたものを図 3 に示す。A:T>T:A の変異が突出して変化量が大きく、非投与群の約 43 倍の変異がこのタイプの変異であった。またサンプル個別に A:T > T:A の頻度をグラフにしたものを図 4 に示す。非投与群においては平均  $4.36 \times 10^{-8}$  の頻度で A:T > T:A の変異が見られたが DEN 投与群においては平均  $1.87 \times 10^{-6}$  の頻度で A:T > T:A の変異が見られた。この二群間における変異頻度の差は統計的に有意であった ( $p < 0.05$ )。 *gpt* アッセイを用いた先行研究において、DEN は A:T>T:A の変異を特徴的に誘導する薬剤であることが報告されており (Akagi et al., 2015)、PECC-Seq 法はラットサンプルにおいても DEN 特有の変異を検出すること可能であったと言える。

#### C-3 残存するエラー要因の解析

TK6 細胞 DNA を用いた検討により、コントロール及び変異原物質 (ENU, EMS) した場合ともに、ライブラリーの末端部位でのエラー頻度が高いことがわかった。

末端 7bp における変異スペクトルを解析した結果、この部位では GC 塩基対の変異が主であることがわかった。その後、共同研究者である上海交通大学の欒教授らの検討により、GC から TA の変異には sonication によって生じる酸化的損傷である 8-oxoG が関与するとともに、GC から CG の変異に関しては、グアニン残基の損傷である 2-

aminoimidazole(Iz)が原因となっていることが明らかとなった。

これらの結果から、PECC-Seq 解析においては、末端 10 塩基分を解析対象から除くことにより、バックグラウンドのエラーを軽減できることがわかった。

しかし、それらを除去後も内部にエラーが残るため、その原因と考えられる損傷した DNA フラグメントを除去する目的で S1 ヌクレアーゼ処理を行った。その結果、sonication により生成される Iz の量は有意に減少し、それに伴って PECC-Seq におけるエラー頻度は 1 桁以上低減した。これらの結果より、S1 ヌクレアーゼ処理は、PECC-Seq 法においても有効であることが確かめられた。これらの検討結果は、ラットサンプルを用いた解析にも応用した。

#### D. 結論

化学物質の各種毒性評価において、ラットを用いた動物試験の結果は比較的ヒトに対する外挿性が高いと考えられており、重要視されている。ecNGS を用いた変異原性評価手法においては、ラットにおける実施例が少なかったが、本研究において我々は ecNGS 手法の一つである PECC-Seq 法を用い、ラット由来試料から変異検出解析を行った。結果として、PECC-Seq 法はラット由来試料から薬剤が誘発する特有の変異を検出することが可能であることが示された。

既存手法である TGR 試験においては、変異スペクトル解析を行うまでに標的臓器からの DNA 抽出、レポーター遺伝子のパッキング、大腸菌へのレポーター遺伝子の導入、コロニー・プラークのカウント、コロニー・プラークからの DNA 抽出とレポーター遺伝子のシークエンスといった煩雑な工程が必要であり、限られた遺伝子の範囲の情報しか得ることができない。一方で、NGS 手法は標的臓器からの DNA 抽出、NGS ライブラリの作製、シークエンス解析といった簡略な工程で変異スペクトルのデータが得られ、さらに TGR 試験よりもサンプル間

差の少ないデータをゲノムワイドに得ることができる。これらの比較から ecNGS 手法は将来的に *in vivo* の変異原性評価手法として TGR 試験を代替する手法になり得ると考えられる。すでに国際的にも、OECD ガイドライン等への組み込みに向けた検討が開始されている。

また TGR を用いない *in vivo* 毒性試験である発がん性試験や反復投与試験の試験個体に対し、ecNGS 手法を用いることにより変異原性評価までを行うような試験のマルチエンドポイント化が原理的に可能である。実際に ecNGS のガイドライン化と併せて、既存の TGR を用いない試験をマルチエンドポイント化することにより、TGR 試験を代替・削減することについても国際的な議論が開始されている。発がん性試験や反復投与試験においてはラットが頻用されることから、ラットサンプルにおける結果を示した本研究は、今後の国際的な議論の上でも意義は高い。

一方で、本年度の研究においては一用量の結果のみを示すのみであった。変異原性評価においては用量反応性があるかどうかについても論点となることから、次年度においては過去の TGR 試験において用量反応性を見たサンプルから NGS 手法による変異検出を行い、用量反応性まで検出可能であるかを検討したい。また、エラー要因の検討結果から得られた知見を元に、ラットサンプルにおけるバックグラウンドのエラーを低減することにより、更なる高感度化をめざしたい。

#### E. 研究発表

##### E-1. 論文発表

1. 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

2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. フォーラム, 東京都 (2023.09)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 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). 54<sup>th</sup> Annual Meeting of the Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS) (2023.9)
9. 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, 千藏さつき, 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, 福岡県 (2023.11)
10. 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

#### E-2. 学会発表

1. 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)
2. 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

#### 別添 4

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)

11. 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)

#### **F. 知的所有権の取得状況**

##### F-1. 特許取得

該当なし

##### F-2. 実用新案登録

該当なし

##### F-3. その他

該当なし

別添 4

表 1. NGS 解析結果の概略

サンプル名	リード数	解析塩基数	変異数	変異頻度 ( $\times 10^{-6}$ )	gptアッセイにおける 変異体頻度* ( $\times 10^{-5}$ ) (Takasu et al.)
Control 3	987,423,042	38,838,583	20	0.51	0.70
Control 8	1,077,081,792	37,591,524	35	0.93	0.52
Control 9	1,065,771,452	38,233,853	60	1.57	0.16
DEN P11	923,538,038	64,822,157	476	7.34	88.89
DEN P13	886,468,356	60,749,075	373	6.14	32.24
DEN P15	812,319,594	56,400,757	350	6.21	76.19



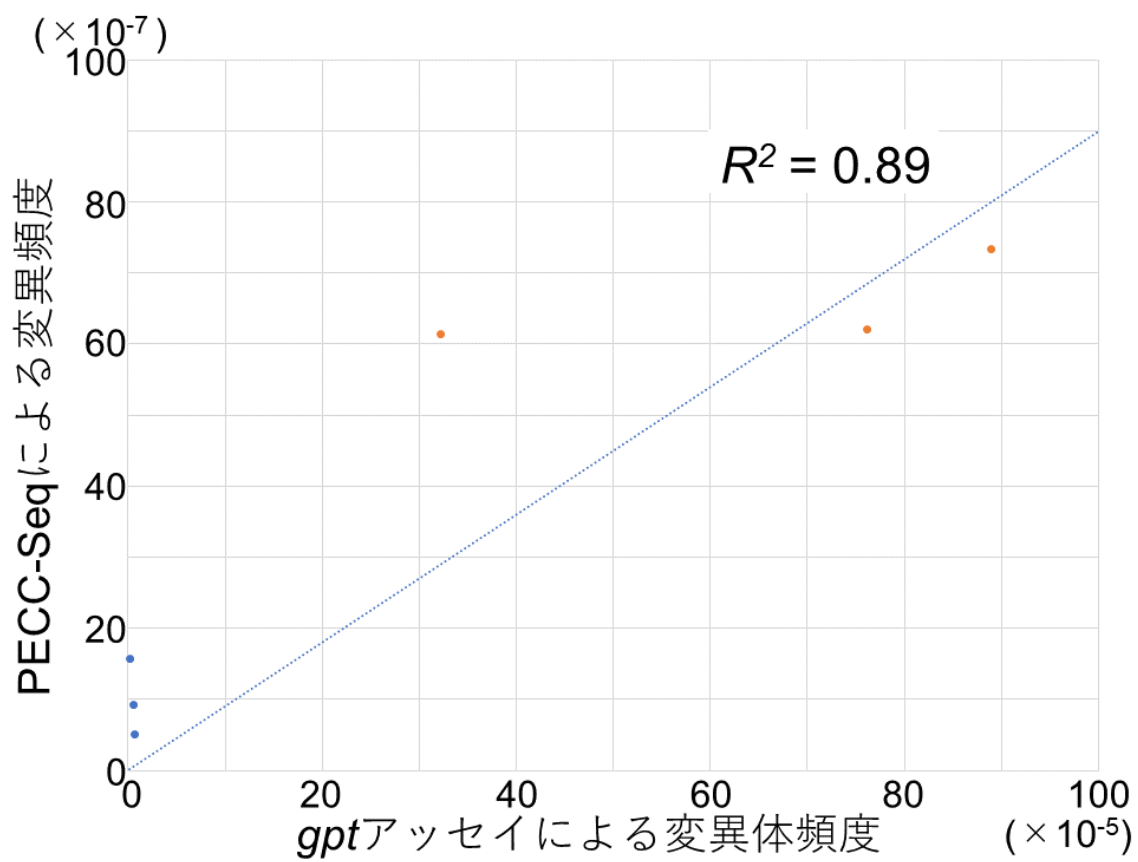


図 1. 既存手法による変異体頻度と NGS 手法による変異頻度比較

別添 4

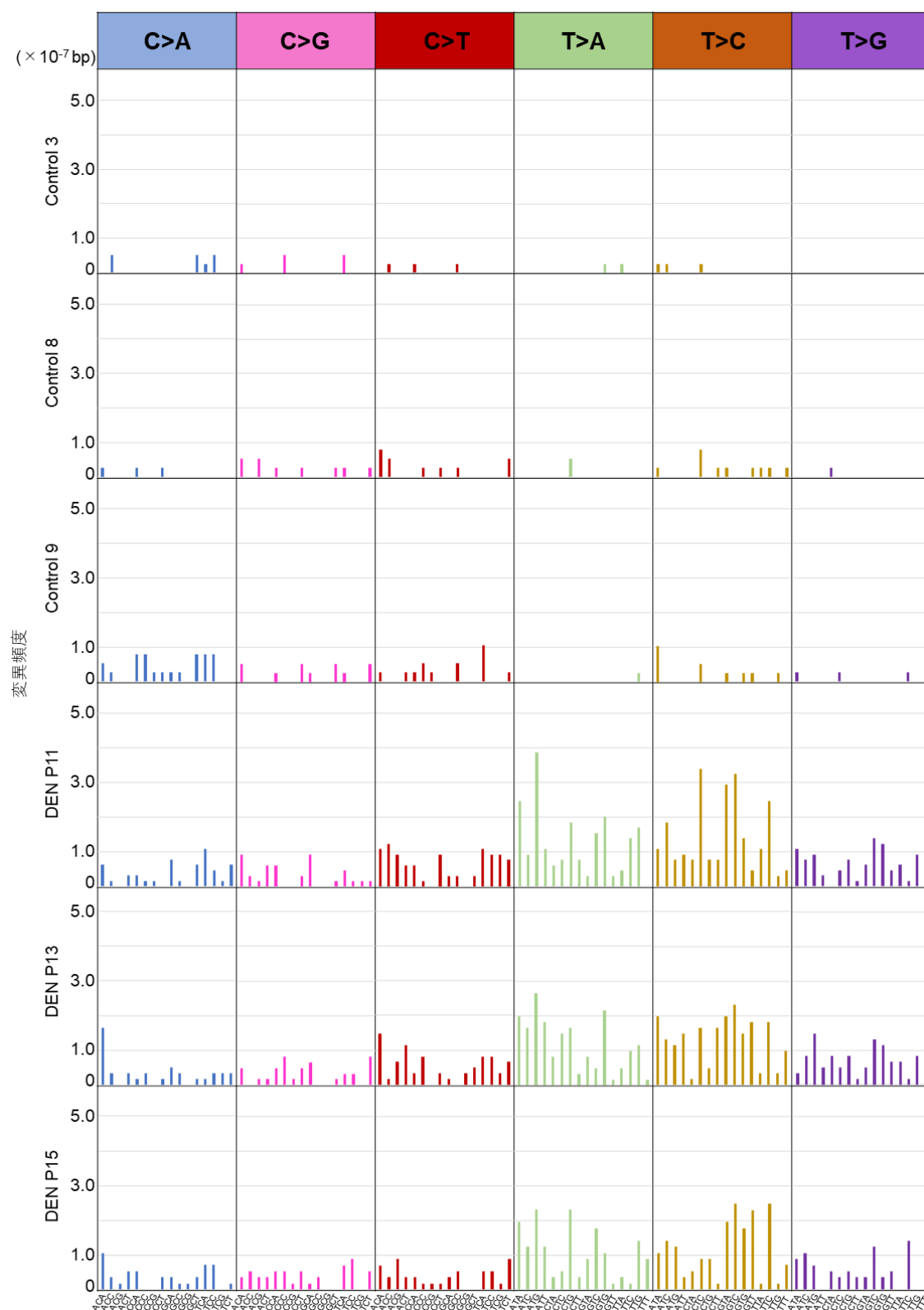


図 2. 非投与群 (Control) と DEN 投与群 (DEN) サンプルの変異スペクトラム

別添 4

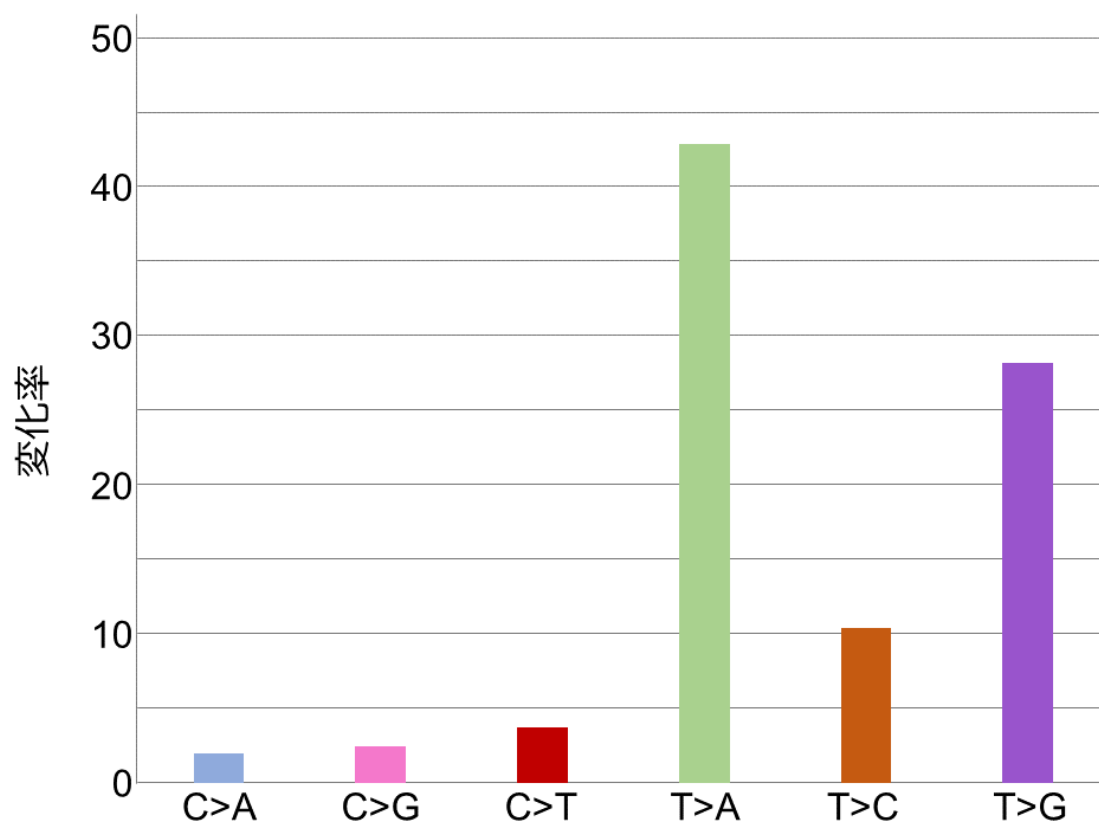


図 3. 非投与群に比した DEN 投与群における各スペクトラムの変異頻度の増加率

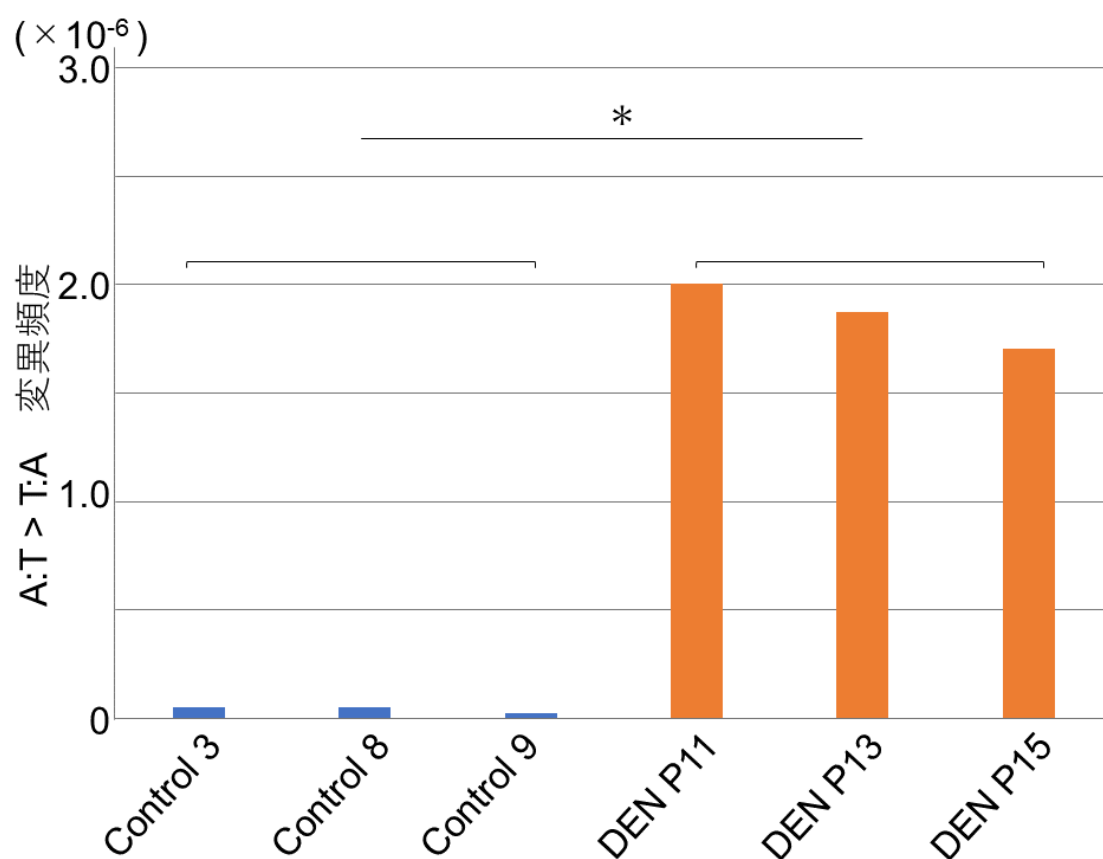


図 4. 各サンプルにおける A:T>T:A の変異頻度

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）  
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

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 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

**研究要旨**

本研究では、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（micronucleated cell; MNC）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。本年度は、令和4年度に取得した小核誘発物質の投与により発現増加した遺伝子の中から、MNCの指標となるタンパクを検索した。また、抗 $\gamma$ -H2AX抗体を用いた免疫組織化学染色（IHC）による小核の検出を検討した。その結果、遺伝子群からMNCの指標となるタンパクは得られなかったものの、抗 $\gamma$ -H2AX抗体を用いたIHCによりMNCの検出が可能であることを確認した。28日間反復投与試験へ適用した結果、その割合は肝臓小核試験の結果と高い相関を示し、検出感度は同等であることを確認した。今後、本法について肝発がん性の定量的評価法として有用性を検討する。染色体不安定性による化学発がん機序として、AA誘発肝腫瘍において高頻度にコピー数増加が認められた*Mdm2*がコードするMDM2タンパクのIHCを行った。その結果、MDM2の発現は変異肝細胞巢の40.0%、肝細胞腺腫の67.9%、肝細胞癌の88.2%の細胞質に認められた。さらに、肝細胞腺腫の32.1%、肝細胞癌の78.4%はc-Myc及びMDM2の両方に陽性であったことから、これらががん遺伝子のコピー数増加が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。

**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あるにもかかわらず、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。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。そこで本研究では、新たな発がん性定量評価を見据えた基盤研究として、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する。

染色体不安定性や細胞分裂異常の結果生じる小核（micronucleus）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。しかしながら、小核そのものの意義や小核が生じた細胞に及ぼす影響については長い間不明なままであった。しかし近年、chromothripsis と呼ばれる現象が明らかになり、小核そのものが発がんの原因になることが報告されている<sup>1)</sup>。Chromothripsis は、小核の核膜の崩壊と染色体の粉碎・再構成の後、細胞質に漏出した染色体が細胞分裂の際に主核に取り込まれる現象である。取り込まれた異常な染色体は劇的な遺伝子変異を引き起こし、一度に複数のがんの発生や進行に関わる遺伝子の発現変化が生じると考えられている<sup>1)</sup>。

実際、chromothripsis の痕跡とされる複雑なコピー数変異は、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンス解析によって様々なヒト腫瘍で見つかっており、これら腫瘍の発生や悪性化の過程に小核が寄与していることが示唆されている<sup>2,3)</sup>。また、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があることが報告されており<sup>4)</sup>、化学発がんの根底にも染色体不安定性が寄与することが示唆されている。

このような背景から、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、小核を有する細胞 (micronucleated cell: MNC) の免疫組織化学染色 (IHC) による検出法の確立を試みる。近年、様々な臓器を用いた *in vivo* 小核試験が検討されているが、肝臓のように肝細胞が大部分を占めるような臓器は稀であり、多くの臓器は特徴の異なる複数の細胞から構成されている。それ故、病理組織学的に MNC を検出することで、陽性となる領域や細胞を特定することが可能になる。また、肝臓小核試験の反復投与方法では 28 日間投与が高感度であることから<sup>4)</sup>、MNC を検出する本法は化審法における 28 日間反復投与毒性試験への組み込みにも適していると考えられる。さらに、過去に実施した毒性試験のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 試料を用いた評価も期待される。

本研究では、28 日間反復投与毒性試験への組み込みが可能な、組織切片を用いた IHC による MNC 検出法の構築を試みる。令和 4 年度は、小核を誘発する肝発がん物質 acetamide (AA), *N*-nitrosopropylamine (NNP) 及び quinoline をラットに投与し、肝臓の網羅的遺伝子発現解析により、共通して発現増加する 34 の遺伝子を抽出した。令和 5 年度はこれら遺伝子がコードするタンパクの中から、MNC の指標となるマーカーを検索した。また、小核では DNA 二重鎖切断に伴うヒストン H2AX のリン酸化が生じることから、抗  $\gamma$ -H2AX 抗体を用いた

IHC による MNC の検出を検討した。

染色体不安定性が化学物質の発がん性評価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についても検討する。前述したように chromothripsis は様々な腫瘍の発生や悪性化に寄与すると考えられている。一方、小核を誘発するラット肝発がん物質は数多く報告されているものの、化学発がん過程における chromothripsis の関与についてはこれまでに報告はない。

本研究では、染色体不安定性による化学発がん機序の解明として、特徴的な大型小核を誘発するラット肝発がん物質 AA<sup>5,6)</sup>で誘発した肝腫瘍における染色体粉碎と再構成の痕跡を検索することで、発がん過程における chromothripsis の関与について検討する。令和 4 年度は、AA 誘発腫瘍においてがん遺伝子である Myc および MDM2 のコピー数が共通して増加していることを明らかにし、腫瘍における c-Myc タンパクの発現を確認した。令和 5 年度は MDM2 タンパクの発現を IHC により検索した。

## B. 研究方法

### B-1. 材料および試薬

AA (>98%), NNP (>98%) 及び quinoline (>97%) は東京化成工業 (東京) から購入した。

### B-2. 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

#### B-2-1. 網羅的遺伝子発現解析による MNC マーカーの検索

IHC には、令和 4 年度に実施した動物実験において、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、SRD5A1 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 Abcam 社製（英国）抗 SRD5A1 ヤギポリクローナル抗体，Invitrogen 社製（米国）抗 LHX8 ラビットポリクローナル抗体，Invitrogen 社製（米国）抗 SRMS ラビットポリクローナル抗体，Invitrogen 社製（米国）抗 OAT 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次抗体として SRD5A1 の染色にはヒストファイン シンプルステインヤギ一次抗体用（ニチレイバイオサイエンス），LHX8, SRMS, OAT の染色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。

#### B-2-2. $\gamma$ -H2AX を指標とした MNC の検出

IHC には，令和 4 年度に実施した動物実験において，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 Cell Signaling Technology 社製（米国）抗  $\gamma$ -H2AX マウスモノ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，外側左葉又は中間葉の小核を有する肝細胞

（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（indica labs 製，米国）にて画像解析を行った。画像解析では計測部位から 0.16 mm<sup>2</sup> の正方形領域をランダムに 6 枚取得し，これら領域に含まれる核の密度から MNHEP を計測した領域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。また，小核と同時に抗  $\gamma$ -H2AX 抗体により陽性を呈する有糸分裂細胞，アポトーシス細胞および DNA 損傷を示唆する細胞（ $\gamma$ -H2AX foci）をカウントし，これらの割合も算出した。AA 投与群の統計学的解析では，F 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 Student の t 検定を用いた。分散が均一でなかった場合は Welch の t 検定を用いた。NNP 及び qunoline 投与群では，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 Dunnett 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。

肝臓小核試験には 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した肝組織を用いた<sup>9)</sup>。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。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。

#### B-2-3. $\gamma$ -H2AX を指標とした病理組織学的肝臓小核試験（HLMN assay）の有用性評価

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

#### 別添 4

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 35 匹を各群 5 匹に配し、対照群と NNP 投与群、quinoline 投与群を設けた。NNP は 5、10 又は 20 mg/kg 体重/日の用量で、quinoline は 15、30 又は 60 mg/kg 体重/日の用量で 4 週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、ヘマトキシリンエオジン染色又は抗  $\gamma$ -H2AX 抗体を用いた IHC を施して、病理組織学的検索又は HLMN assay に供した。また、AA を 0.625、1.25 又は 2.5% の濃度で 4 週間混餌投与した F344 ラット肝臓のパラフィンブロックを薄切して組織切片を作製した。これらの切片は、抗  $\gamma$ -H2AX 抗体を用いた IHC を施して、HLMN assay に供した。ホルマリン固定後の一部の肝組織は肝臓小核試験に供した。

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 Dunnett 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。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。

#### B-3. 染色体不安定性による化学発がん機

#### 序の解明

過去に F344 ラットに acetamide を 2.5% の濃度で 26~30 週間混餌投与し、得られた肝腫瘍の標本 (変異肝細胞巢 (FCA) 10 例、肝細胞腺腫 (HCA) 28 例、肝細胞癌 (HCC) 51 例) を解析に用いた。

MDM2 の IHC には、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腫瘍組織標本を薄切した組織切片を用いた。キシレン、無水エタノールにて脱パラフィンした後、3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 abcam 社製 (英国) 抗 MDM2 ラビットポリクローナル抗体を用い、室温で 1 時間インキュベートした。Phosphate-buffered saline にて洗浄後、2 次抗体としてニチレイバイオサイエンス社製 (東京) ヒストファイン シンプルステイン (ウサギ第一抗体用) にて 30 分間インキュベートした。発色には diaminobenzidine を用いた。なお、比較として diethylnitrosamine (DEN) と phenobarbital で誘発した HCA 及び HCC についても染色を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者が実施し、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルラン麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。実験動物に関しては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。

#### **C. 研究結果**

##### C-1. 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

##### C-1-1. 網羅的遺伝子発現解析による MNC マーカーの検索

抗 SRMS 抗体および抗 SRD5A1 抗体を用いた IHC では、投与群と対照群ともに特



異的な陽性像は見られなかった。抗 LHX8 抗体を用いた IHC では、投与群と対照群において核が顆粒状の陽性像を呈したものの、MNC 特異的な染色像はみられなかった。抗 OAT 抗体を用いた IHC では、投与群と対照群ともに核と細胞質にびまん性の陽性像を認めたものの、MNC に特異的な染色像は見られなかった (Fig.1)。

#### C-1-2. $\gamma$ -H2AX を指標とした MNC の検出

抗  $\gamma$ -H2AX 抗体を用いた IHC の結果、小核は陽性を呈した。また、DNA 損傷を示唆する  $\gamma$ -H2AX foci の出現に加え、有糸分裂細胞及びアポトーシス細胞も陽性を呈した (Fig.2)。

AA を 1.25% の濃度で 4 週間、NNP および quinoline を 40 及び 120 mg/kg 体重/日の用量で 2 週間投与したラット肝臓の組織切片について、抗  $\gamma$ -H2AX 抗体を用いた免疫組織化学的染色を施し、陽性を呈した小核をカウントし、MNHEP の割合を算出した結果、各投与群では対照群に比して有意な高値を示した (Fig.3A)。また、令和 4 年度に同試料で実施した肝臓小核試験の結果と比較した結果、MNHEP の割合は肝臓小核試験で得られた割合の 1/10 程度の低値を示した。一方、これらの結果の間には正の相関 ( $R^2=0.9035$ ) が見られた (Fig.3B)。

#### C-1-3. $\gamma$ -H2AX を指標とした HLMN assay の有用性評価

NNP 及び quinoline を 3 用量で 28 日間反復投与したラット肝臓の最終体重および臓器重量を Table 1 に示す。NNP 投与群は中間用量群から肝相対重量の有意な低値が見られ、高用量群では体重及び絶対重量の有意な低値が認められた。Quinoline 投与群では中間用量群から肝絶対重量および相対重量の有意な高値が見られた。

病理組織学的検索の結果を Fig.4 および Table2 に示す。NNP 投与群では、低用量群から肝細胞の空胞化、単細胞壊死、巨大

核、中間用量から有糸分裂像の増加、高用量群では卵円系細胞の過形成が見られた。quinoline 投与群では、低用量群から肝細胞の空胞化および巨大核が見られ、高用量群では肝細胞の単細胞壊死が見られた。

肝臓小核試験および HLMN assay の結果を Fig.5 および 6 に示す。いずれの被検物質でも両試験において低用量群から MNHP の割合の有意な増加が確認された。また、これらの結果の間には正の相関 ( $R^2=0.9084$ ) が認められた (Fig.7)。NNP 高用量群における MNHEP の割合は、肝臓小核試験では対照群に比して 24 倍の上昇だったのに対し、HLMN assay では 94 倍の上昇を示した。また、quinoline 投与群における MNHEP の割合の SD 値は、肝臓小核試験に比べ HLMN assay で低値を示した。

MNHEP の割合に対し、 $\gamma$ -H2AX foci、有糸分裂細胞及びアポトーシス細胞の割合をそれぞれプロットした結果、遺伝毒性物質の NNP、quinoline と非遺伝毒性物質の AA ではそれらの分布が異なる傾向が見られた (Fig.8)。

#### C-2. 染色体不安定性による化学発がん機序の解明

IHC を用いて *Mdm2* 遺伝子がコードする MDM2 タンパクの検出を行った結果、FCA の 40.0%、HCA の 67.9%、HCC の 88.2% で陽性所見を認めた (Fig. 9 および 10)。一方、DEN と phenobarbital で誘発した肝腫瘍において陽性所見は認められなかった。

また、令和 4 年度に実施した c-Myc タンパクの発現解析の結果を組み合わせると、FCA の 10%、HCA の 32.1%、HCC の 78.4% で両タンパクの発現を認めた (Fig. 11)。

#### **D. 考察**

##### D-1. 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

令和 4 年度に実施した網羅的遺伝子発現解析から抽出した 34 の遺伝子の中から、MNC の指標となるタンパクを検索した。こ

れら遺伝子がコードするタンパクのうち、核又は細胞質に局在し、ラットに交差性があり、IHC に対応した抗体が入手できた SRMS, SRD5A1, LHX8 および OAT について検討を行ったものの、いずれも MNC に特異的な陽性像は見られなかった。いずれの剤においても MNC は肝細胞全体の 5% 前後であったことから、本結果は、マイクロアレイ解析において MNC が特異的に発現する遺伝子を捉えられなかったことに起因すると考えられた。

一方、抗  $\gamma$ -H2AX 抗体を用いた IHC では、既報どおり小核が陽性を呈した。本法を用いてカウントした MNHEP の割合は肝臓小核試験と高い相関を示したことから、抗  $\gamma$ -H2AX 抗体を用いることで病理組織学的に MNC の評価が可能と考えられた。HLMN assay において検出される MNHEP の割合が肝臓小核試験よりも低値であったことは、肝臓小核試験が細胞全体を評価するのに対し、HLMN assay は細胞の一断面を観察しているためと考えられた。一方、肝臓小核試験では細胞分散の過程で細胞傷害を受けた MNHEP を損失することが懸念されている。実際、組織傷害が見られた NNP や quinoline 投与群では肝臓小核試験に比して、前処理を必要としない HLMN assay で感度の上昇や SD 値の低下が見られた。このことは、HLMN assay の優位性の一つと考えられた。

MNHEP の割合と  $\gamma$ -H2AX foci, 有糸分裂細胞及びアポトーシス細胞の割合をプロットした結果、遺伝毒性物質と非遺伝毒性物質により異なる分布を示す傾向がみられた。これらはいずれも発がんに関連する変化であることから、MNHEP との同時解析は発がん性評価の一助になることが期待された。

#### D-2. 染色体不安定性による化学発がん機序の解明

令和 4 年度に実施した AA 誘発腫瘍における c-Myc 陽性率に比較し、FCA および

HCA において MDM2 の陽性率が高ったことは、細胞の腫瘍化において MDM2 の高発現による p53 抑制が重要な役割を担っていることを示唆すると考えられた。一方、c-Myc は HCC において高い陽性率を示すことから、腫瘍の悪性化に寄与しているものと考えられた。

### **E. 結論**

#### E-1. 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

抗  $\gamma$ -H2AX 抗体を用いた IHC により MNHEP を検出する 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、本法において同時に検出される  $\gamma$ -H2AX foci, 有糸分裂細胞及びアポトーシス細胞の変化は、HLMN assay による肝発がん性評価の一助になることが期待された。今後、様々な化学物質について本法による評価を実施し、肝発がん性評価法としての有用性を検討する。

#### E-2. 染色体不安定性による化学発がん機序の解明

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が明らかになった。今後、これらのコピー数変異と染色体再構成の関係について検討を行う。

### **F. 健康危険情報**

特になし

### **G. 研究成果**

#### G-1. 発表論文

1. 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.* 2024, 198 (1), 40-49, doi: 10.1093/toxsci/kfad131.
2. 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, doi: 10.1016/j.mrgentox.2024.503729.
  3. 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.* 2023, 97 (12), 3273-3283, doi: 10.1007/s00204-023-03610-4.
  4. 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.* 2023, 179, 113965, doi: 10.1016/j.fct.2023.113965.
  5. 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* 2023, 30 (1), 9-22, doi: 10.18891/jjfc.30.1\_9.
- G-2. 学会発表**
1. Acetamide の肝発がんに関与する肝細胞質内封入体の形成機序, 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, 日本薬学会第 144 年会 2024 年 3 月, 神奈川
  2. 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, 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, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
  3. 免疫組織化学染色による小核化肝細胞の検出, 笠松健吾, 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, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
  4. SD ラットを用いた decyltrimethoxysilane の 13 週間反復投与試験, 高須伸二, 石井雄二, 相馬明玲, 松本真理子, 小川久美子, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
  5. 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, 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, 第 52 回日本環境変異原ゲノム学会 2023 年 11 月, 福岡
  6. 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, 増村 健一, 安東 朋子, 石井 雄二, 杉山 圭一, 第 52 回日本環境変異原ゲノム学会 2023 年 11 月, 福岡
  7. 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, 赤根 弘敏, 豊田 武士, 石井 雄二, 高須 伸二, 小川 久美子, 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 8 月, 神奈川
  8. 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, 石井 雄二, 高須 伸二, 小川 久美子, 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 8 月, 神奈川
  9. 齧歯類に見られる acetamide の肝発がん性の種差に関する研究, 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, 第 50 回日本毒性学会学術年会 2023 年 6 月, 神奈川
10. 化学発がんにおける chromothripsis の関与, 石井 雄二, 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
11. 2-Isopropyl-N-2,3-trimethylbutylamide の包括的毒性評価, 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, 日本食品化学学会 第 29 回総会・学術大会 2023 年 6 月, 富山
12. 食品香料の安全性に関する研究, 石井雄二, 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
- 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., Kawasaki 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.
- 5) Nakamura K., Ishii Y., Takasu S., Nohmi T., Shibutani M., Ogawa K. Lack of in vivo mutagenicity of acetamide in a 13-week comprehensive toxicity study using F344 gpt delta rats. *Toxicol. Sci.* 2020, 177, 431-440, doi: 10.1093/toxsci/kfaa126.
- 6) Nakamura K., Ishii Y., Takasu S., Nohmi T., Shibutani M., Ogawa K. Chromosome aberrations induced by the non-mutagenic carcinogenic acetamide involve in rat hepatocarcinogenesis through micronucleus formation in hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 2021, 95, 2851-2865, doi: 10.1007/s00204-021-03099-9.
- 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
- H. 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.

別添 4

Table 1 Body and organ weights data for F344 rats treated with NNP and quinoline for 4 weeks

	Control	NNP (mg/kg/day)			Quinine (mg/kg/day)		
		5	10	20	15	30	60
No. of animals	5	5	4	5	5	4	5
Body weight	238.2 ± 0.4*	239.2 ± 16.7	230.8 ± 18.3	212.1 ± 9.3**	236.2 ± 4.5	235.5 ± 12.2	233.6 ± 7.7
Absolut (g)							
Liver	7.43 ± 0.40	7.71 ± 0.64	6.91 ± 0.75	6.06 ± 0.20**	7.56 ± 0.21	8.39 ± 0.54*	10.24 ± 0.45**
Relative (g/100gBW)							
Liver	2.99 ± 0.08	2.84 ± 0.12	2.77 ± 0.14*	2.52 ± 0.12**	3.20 ± 0.09	3.56 ± 0.07**	4.39 ± 0.18**

<sup>a</sup>Mean ± SD

\*, \*\*Significantly different from the control group at p < 0.05, 0.01, respectively.

Table 2 Hsitolopathological findings for F344 rats treated with NNP and quinoline for 4 weeks

Findings (±,+,++,+++)	Control	NNP (mg/kg/day)			Quinine (mg/kg/day)		
		5	10	20	15	30	60
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
Vacuolar,hepatocyte,centrilobular	0	5(4/1/0/0)	5(3/2/0/0)	5(0/5/0/0)	2(2/0/0/0)	5(5/0/0/0)	5(3/2/0/0)
Mitosis,hepatocyte	0	0	2(2/0/0/0)	4(4/0/0/0)	0	0	0
Apoptosis	0	1(1/0/0/0)	5(1/3/1/0)	5(0/0/5/0)	0	0	3(3/0/0/0)
Karyomegaly,hepatocyte	0	3(3/0/0/0)	2(2/0/0/0)	5(4/1/0/0)	3(3/0/0/0)	4(4/0/0/0)	5(5/0/0/0)
Oval cell hyperplasia	0	0	0	5(5/0/0/0)	0	0	0
Mononuclear cell infiltration	0	1(1/0/0/0)	0	0	0	0	0

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

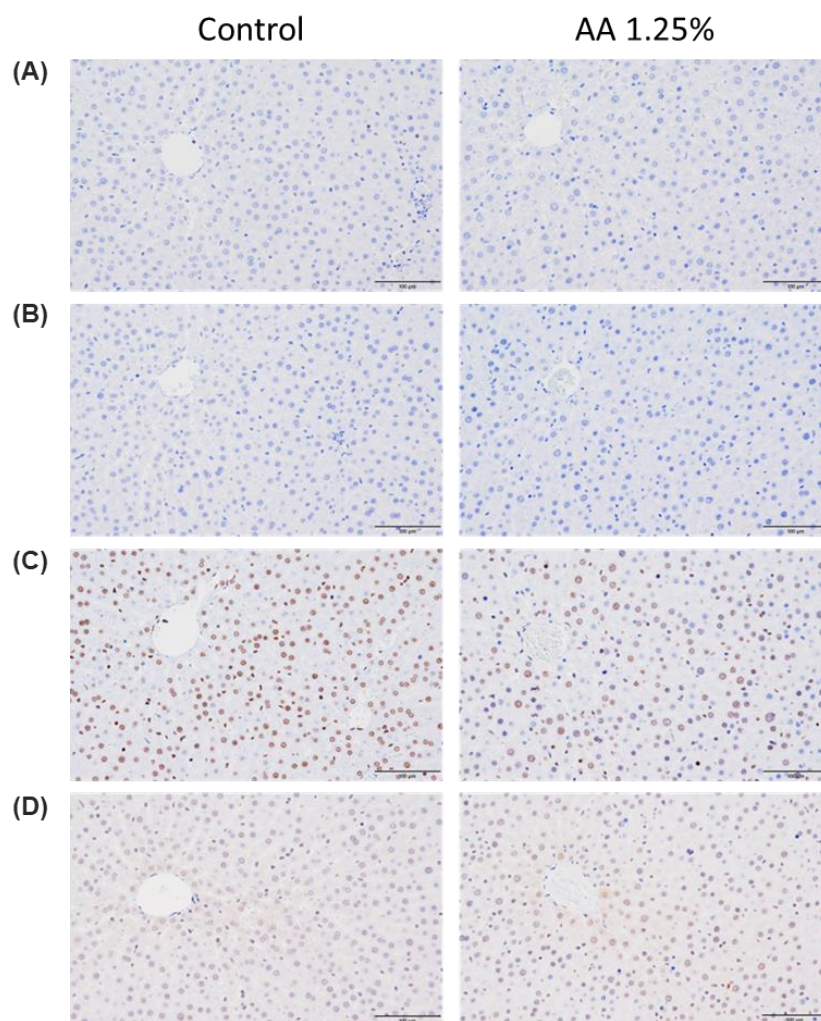


Figure 1. Representative photographs of immunohistochemical staining of (A) SRMS, (B) SRD5A1, (C) LHX8 and (D) OAT in the livers of rat.

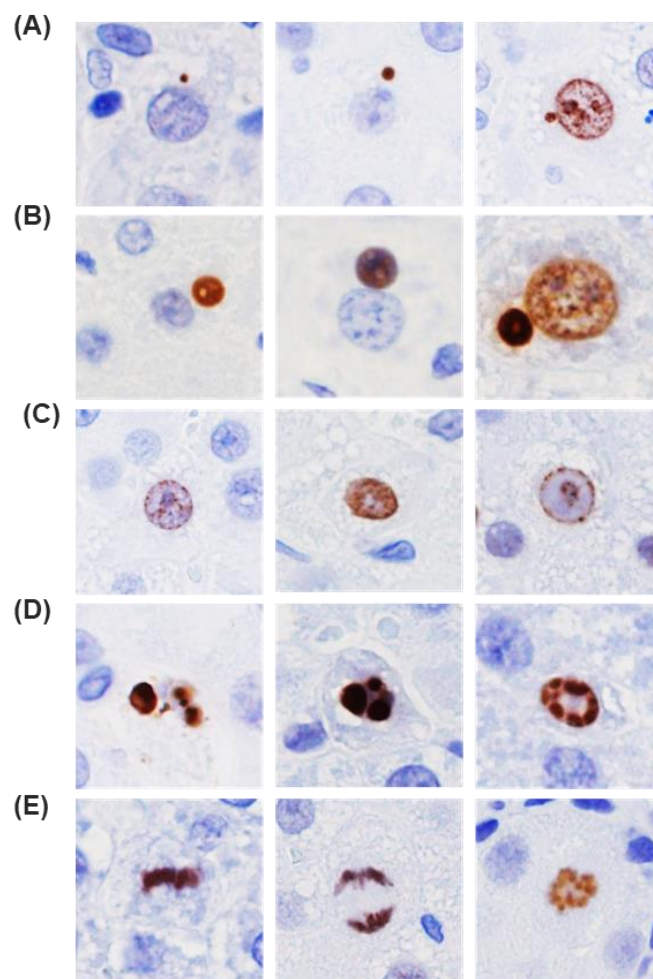


Figure 2. Representative photographs of  $\gamma$  - H2AX-positive hepatocytes. (A) micronucleated hepatocytes, (B) large micronucleated hepatocytes, (C) DNA damaged foci, (D) apoptotic hepatocytes and (E) mitotic hepatocytes

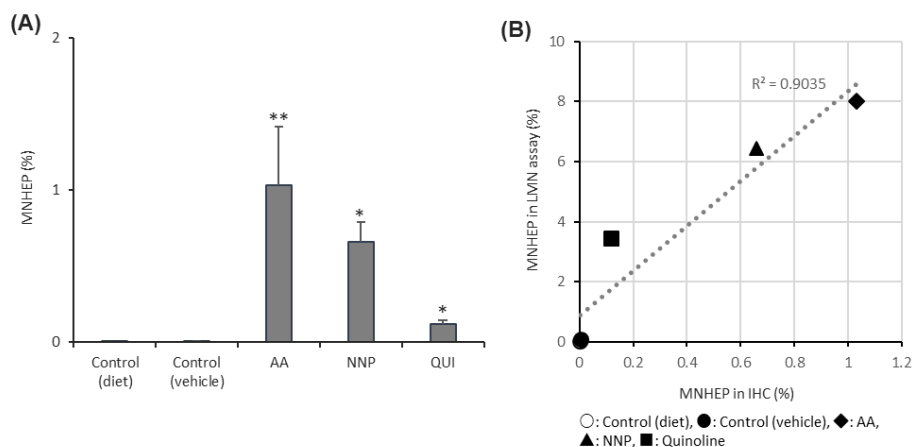


Figure 3. (A) The ratio of MNHEP analyzed by immunohistochemical staining of  $\gamma$ -H2AX. (B) Correlation between MNHEP ratio analyzed by immunohistochemical staining for  $\gamma$ -H2AX and liver micronucleus assay. \*, \*\*: Significantly different from the control group at  $p < 0.05$ ,  $0.01$ , respectively.



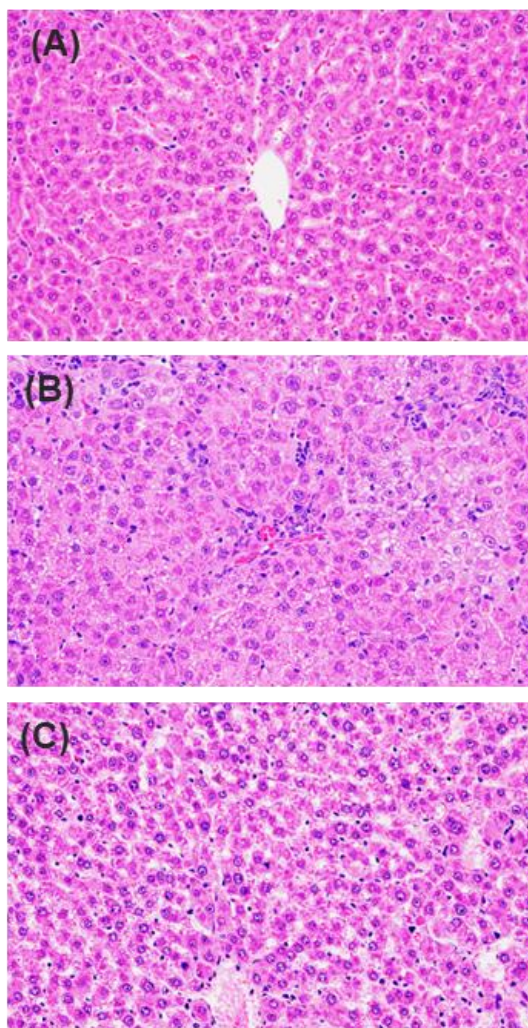


Figure 4. Representative photographs of livers of F344 rats treated with (A) vehicle, NNP (20 mg/kg body weight/day) and (C) quinoline (60 mg/kg body weight/day) for 4 weeks

別添 4

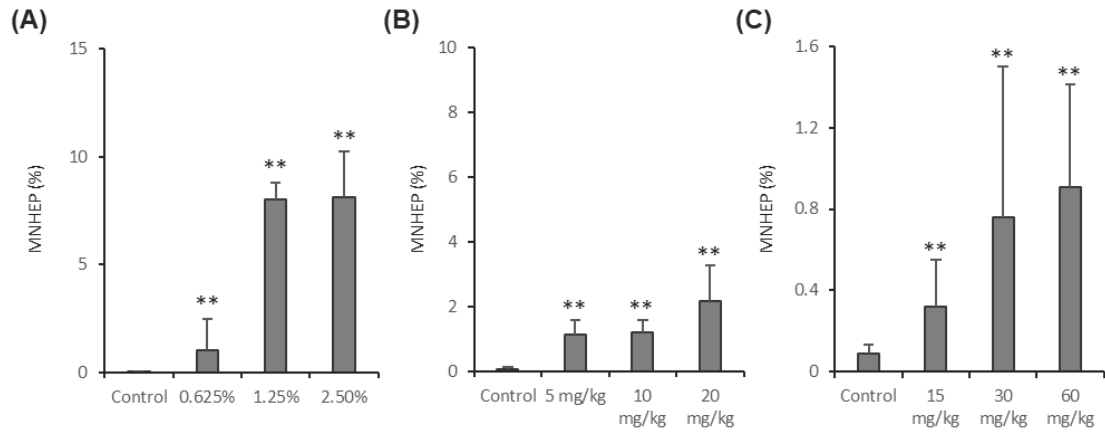


Figure 5. The ratio of MHHEP analyzed by liver micronucleus assay in the livers of rat treated with (A) AA, (B) NNP and (C) Quinoline for 4 weeks. \*\*: Significantly different from the control group at  $p < 0.01$ .

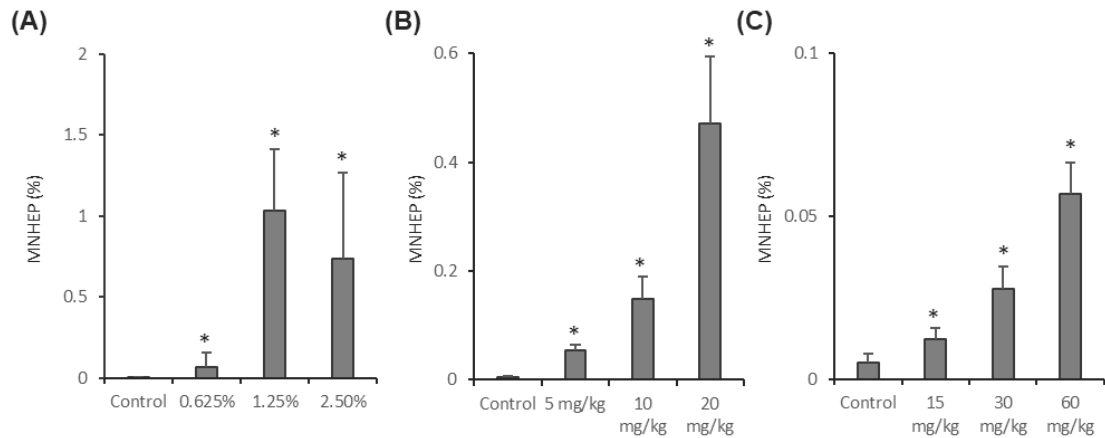


Figure 6. The ratio of MHHEP analyzed by HLMN assay in the livers of rat treated with (A) AA, (B) NNP and (C) Quinoline for 4 weeks. \* : Significantly different from the control group at  $p < 0.05$ ,  $0.01$ , respectively.

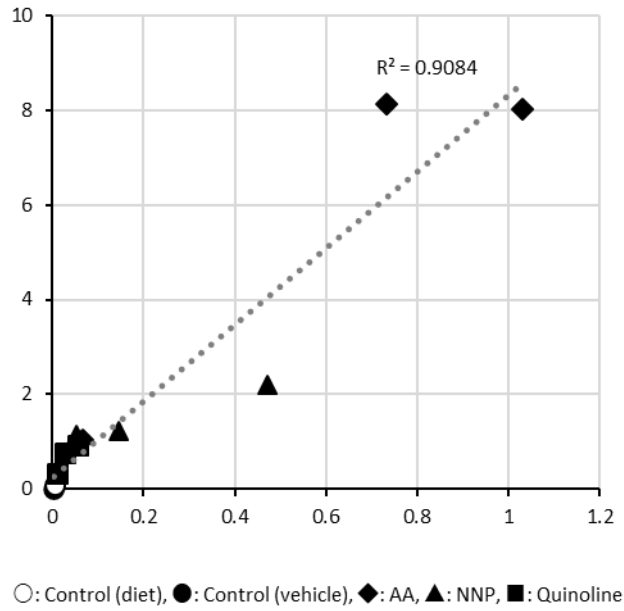


Figure 7. Correlation between MNHEP ratio analyzed by HLMN assay and liver micronucleus assay in the livers of rat treated with AA, NNP and Quinoline for 4 weeks.

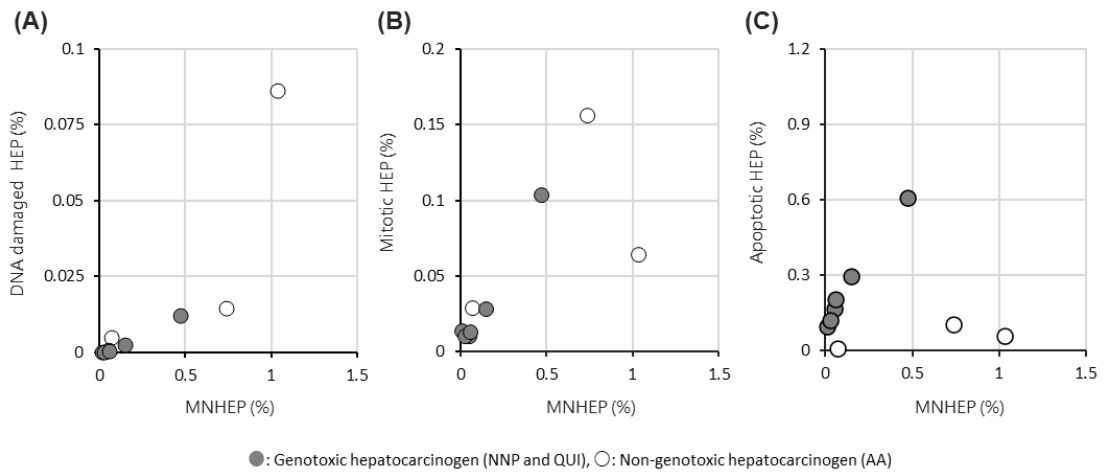


Figure 8. 2D plot of ratio of (A) DNA damaged foci, (B) mitotic hepatocyte and (C) apoptotic hepatocyte versus MNHEP analyzed by HLMN assay in the livers of rat treated with AA, NNP and Quinoline for 4 weeks.

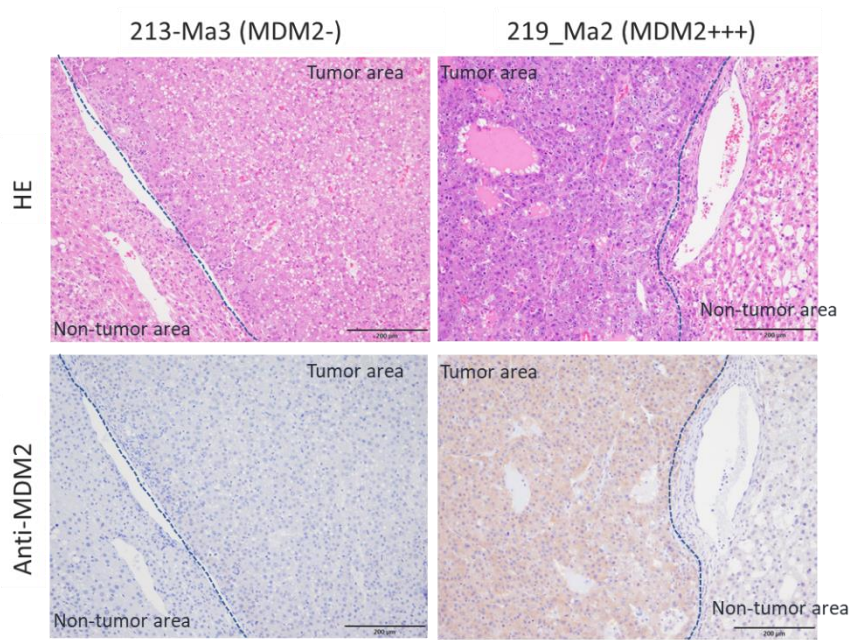


Figure 9. HE and Immunohistochemical stain with anti-MDM2 antibody, positive expression in tumor cells in the AA-induced HCC.

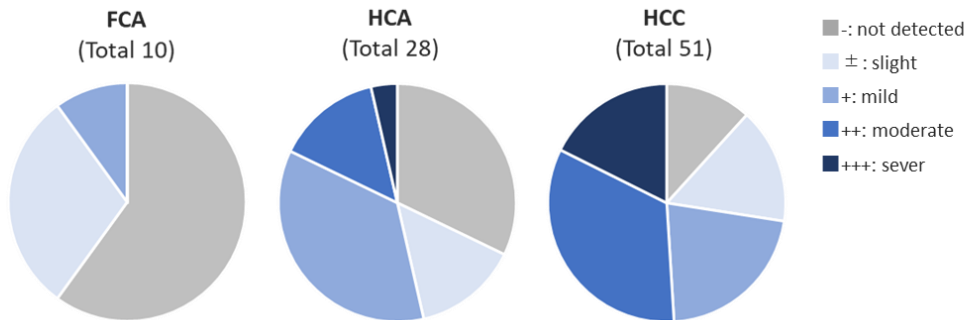


Figure 10. The ratio of Mdm2 positive tumor in the AA-induced FCA, HCA and HCC.

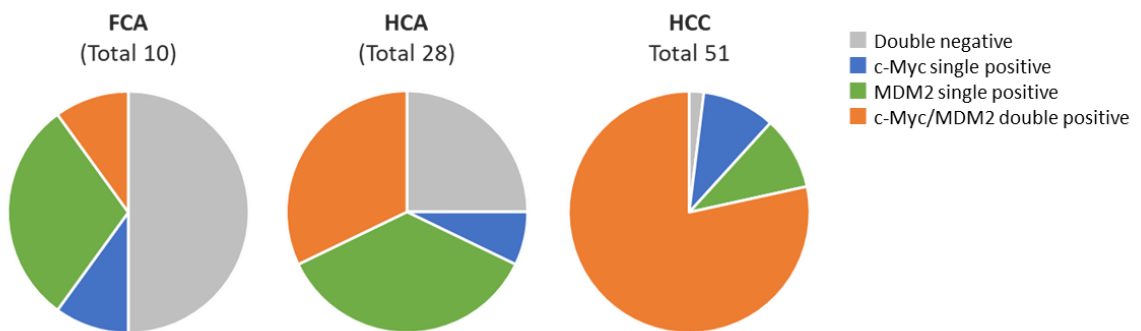


Figure 11. The ratio of c-Myc and Mdm2 positive tumor in the AA-induced FCA, HCA and HCC.