

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）
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 5 年度からは、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・進め方の検討を行うこととした。

2物質（ジイソブチル＝ヘキサンジオアート (CAS RN: 141-04-8)）及びノナンー 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では、各々が「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」の前例となった。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。

これらのケーススタディの結果を踏まえ、上記 2 つと同様の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）。

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。

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。前年度から、化審法のスクリーニング評価に活用することを前提とした独自のリードアクロス (RA) のあり方を提案することを目指したケーススタディを実施した。ケーススタディは、過去の化審法のためのスクリーニング評価において、RA による

評価結果を提案したものの、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 2 物質（ジイソブチル＝ヘキサンジオアート (CAS RN: 141-04-8)）及びノナンー 1 -オール (CAS RN: 143-08-8)を対象とした。各々のケーススタディの結果を、以下に示す。また、ケーススタディを踏まえ、今後同様の RA による評価を行う場合のあり方（進め方）を提案する。

B. 研究方法

1. ジイソブチル＝ヘキサンジオアート

本物質は、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。本物質については、昨年度の取組みによりアルキル鎖部分が短長の 6 物質の類似物質候補（参考資料 1）を得て、これらに関する一般毒性、生殖発生毒性、発がん性について簡易的に評価した。また、類似物質候補の OECD QSAR Toolbox による代謝物予測の結果、アジピン酸とアルコール部分を含む代謝物が推定され、類似物質候補である Diisopropyl adipate (CAS. 6938-94-9) と Diethylhexyl adipate (CAS. 103-23-1) については、アジピン酸とアルコールに代謝されることを確認した。そのため、今年度は、ジイソブチル＝ヘキサンジオアートの RA による評価について、類似物質候補の毒性評価（スクリーニング評価）を完結し、ジイソブチル＝ヘキサンジオアートの各毒性項目に関する有害性クラスを類推することを試み、さらに代謝物（アジピン酸とアルコール類）の評価を行い、ジイソブチル＝ヘキサンジオアートに関する有害性クラスの類推結果を補強できるかを検討した。

2. ノナンー 1 -オール

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ついては炭素鎖長 12 (C12) アルコール 1 物質に基づく評価値を、遺伝毒性については C8 やその分岐アルコールの評価結果に基づき RA による評価案を作成したが、予審にて毒性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った。昨年度の取組みの結果、C5～22 の直鎖アルコールを類似物質候補とするのが妥当と判断した。また、

C9 のノナンー 1 -オールの他、化審法の優先評価化学物質（通し番号 170: 生態影響を根拠に優先指定）である C10 のデカンー 1 -オール (CAS. 112-30-1) についても、人健康影響についてスクリーニング評価の対象となっていることから、本検討において C9 と同様に RA による評価を行うこととした。

昨年度までに、類似物質候補の有害性情報収集を完了していたことから、今年度は各々の類似物質候補について、得られた有害性情報に基づき 4 つの毒性項目（一般毒性、生殖発生毒性、遺伝毒性、発がん性）についてスクリーニング評価案を作成し、個別シート（スクリーニング評価において委員に回覧するための様式）を作成した。また、毒性項目毎に、各類似物質候補の毒性試験結果（毒性所見の特徴）を把握し、特定の類似物質候補に特異的な毒性所見が生じているか否かを確認し、C9 及び C10 の各毒性項目について長短の炭素鎖長の直鎖アルコールの毒性情報に基づき挟み込みで類推することが可能かを確認した。さらに、各類似物質候補の物理化学的性状を調査し、毒性影響についても物理化学的性状の面でも類似物質候補が妥当かを検討した。

以上の 2 つのケーススタディに基づき、スクリーニング評価において「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」と同様の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）を提案した。

C. 結果

1. ジイソブチル＝ヘキサンジオアート

1-1. 類似物質候補の毒性評価

ジイソブチル＝ヘキサンジオアートの類似物質候補のうち、炭素鎖長が比較的同等である以下 3 つの類似物質候補について、スクリーニング評価を行い、各々の有害性クラス（案）を提案した。

1) CAS. 105-99-7 Dibutyl adipate

この物質は、継続的に暴露クラスが5または外のため、スクリーニング評価の対象外であるが、本検討においてスクリーニング評価を行った。本物質については、厚労省により過去に28日間反復投与試験、生殖発生毒性試験、Ames試験、*in vitro* 染色体異常試験が実施されていた。評価結果の概要を以下に示す。

一般毒性については、ラットを用いた28日間反復投与試験（強制経口投与）を行った結果、最高用量1000 mg/kg/dayで毒性影響がみられなかったことから、NOAEL 1000 mg/kg/dayと判断し、このNOAELを不確実係数積（UFs）600（種差10、個体差10、試験期間の不足6）で除した1.67 mg/kg/dayを有害性評価値（D値）として導出し、有害性クラス「外」と判断した。

生殖発生毒性については、雌雄ラットに交配前、交配期間中ならびに雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して哺育3日まで、本物質を0, 100, 300, 1000mg/kg/dayの用量で経口投与し、親ラットの生殖能力および次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した結果、親動物の一般毒性、生殖能に毒性影響は認められなかったが、児動物では、1000 mg/kg/dayで哺育4日の新生児生存率低下、哺育0日および4日の体重低値（軽度）を示した。児動物の生存児数や体重のデータを精査した結果、1000 mg/kg/dayでみられた哺育4日の新生児生存率低下や哺育0日および4日の軽度な体重低値は、ばらつきの範囲内であり、毒性学的意義はないと判断した。以上より、親動物及び児動物に対するNOAELはいずれも1000 mg/kg/dayと判断し、このNOAELをUFs 1000（種差10、個体差10、試験の質（多世代影響を評価できない）10）で除した1 mg/kg/dayをD値として導出し、有害性クラス「外」と判断した。

遺伝毒性については、Ames試験陰性、*in vitro* 染色体異常試験陽性だが、*in vivo* 小核

試験が陰性であったことから、*in vitro* 染色体異常の陽性結果を否定し、有害性クラス「外」と判断した。

発がん性については、いずれの評価機関も発がん性区分を付してなかったため、有害性クラスは「情報なし」とした。

2) CAS. 6938-94-9 Diisopropyl adipate

この物質は、継続的に暴露クラスが外のためスクリーニング評価の対象外であるが、本検討においてスクリーニング評価を行った。本物質については、有害性情報がほとんどなく、十分なスクリーニング評価ができなかったため、可能な限り評価した。評価結果の概要を以下に示す。

一般毒性については、1用量で実施した28日間反復投与試験（強制経口）しかなかった。ラットに1000 mg/kg/dayの本物質を投与した結果、毒性影響は認められなかったことから、NOAEL 1000 mg/kg/dayと判断し、この値をUFs 600（種差10、個体差10、試験期間の不足6）で除した1.67 mg/kg/dayをD値とし、有害性クラス「外」と判断した。通常のスクリーニング評価では、1用量の試験は用量反応関係を評価できないため不採用とするが、この試験では毒性試験における設定可能な最高用量において毒性影響がみられなかったことから、結果を採用して評価した。

生殖発生毒性については、経口又は吸入暴露した試験結果がなく、前述の28日間試験で生殖器や性周期が検索されただけであったため、生殖能や発生に関する評価ができず、有害性クラスは「情報なし」とした。なお、参考扱いにした妊娠期間中に3回腹腔内投与した発生毒性試験（Singh et al., 1973.）では、359.67 mg/kg/day以上の用量で、軽度の肉眼的及び骨格の異常（詳細不明）が報告されている。

遺伝毒性については、スクリーニング評価において最低限必要なAmes試験及び*in vitro* 染色体異常試験の結果が無いため、有害性クラスが「情報なし」とした。

発がん性についても、いずれの評価機関も発がん性区分を付してなかったため、有害性クラスは「情報なし」とした。

3) CAS. 103-23-1 Diethylhexyl adipate

この物質は、既にスクリーニング評価が行われ審議済みであったが、評価結果が古く見直しが必要であったことから、改めて評価した。その結果の概要を以下に示す。

一般毒性について、スクリーニング評価では、他機関が有害性評価値に相当する値(例：TDI, RfD, RfC, MRL)を設定している場合は、その中で最小の値を優先して採用することになっている。本物質については、WHO の飲料水質ガイドラインが *tolerable daily intake* (TDI)を設定していたことから、通常であればその値 0.28 mg/kg/day を採用し、有害性クラスは4と判断する。EPA IRIS も RfD を設定していたが、いずれの値も根拠が生殖毒性試験及び1世代生殖発生毒性試験であったことから、本評価では一般毒性の評価値としてこれらの値を採用しなかった(後述の生殖発生毒性の評価で採用)。入手できた一般毒性試験について精査した結果、最終的にラット2年間反復混餌投与試験の結果を採用し、体重増加抑制に基づく NOAEL 600 mg/kg/day を UF_s 100 (種差 10、個体差 10) で除した 6 mg/kg/day を D 値とし、有害性クラス「外」と判断した。

生殖発生毒性については、前述の通り WHO の飲料水質ガイドラインが TDI を設定していたことから、その値 0.28 mg/kg/day を採用し、有害性クラスは「4」と判断した。この値は、妊娠 Wistar ラット (24 匹/群) に本物質を 0、300、1,800、12,000 ppm (0、28、170、1,080 mg/kg/日相当) の用量で妊娠 1 日目から 22 日目まで混餌投与した発生毒性試験(ICI, 1988)で、1,800 ppm 以上の群の胎児に骨化減少、尿管の拡張、尿管のねじれが観察されたことから、胎児の発生毒性の NOAEL 300 ppm (28 mg/kg/day) と判断され、不確実係数積 100(種差 10、個体差 10) で除して導出されたものである。EPA IRIS

も RfD 0.6 mg/kg/day を設定しているが、WHO の TDI の方が低値であるため、最終的には 0.28 mg/kg/day を D 値として採用し有害性クラスを付した。

遺伝毒性については、Ames 試験陰性、*in vitro* 染色体異常試験陽性であったが、*in vivo* の染色体異常試験や小核試験が陰性であったことから、*in vitro* 染色体異常の陽性結果を否定した。また、優性致死試験及び不定期 DNA 合成試験において陽性結果があったが、精査した結果、いずれも高い用量での陽性結果であり、試験の妥当性が低いこと等が確認されたため、これらの陽性結果を採用せず、有害性クラス「外(専門家判断)」として、これらの判断の妥当性について予審・本審にて判断を仰ぐことにした。

発がん性については、US EPA が C (possible human carcinogen)と判断していたことから、本来であれば発がん性分類は「2」となるが、EPA が根拠としたマウス肝腫瘍は、PPAR を介するペルオキシソーム増生に関連するマウス特異性の高い発がん機序であることから、人への外挿性はないと考えられる。過去の評価案でも採用していないことから、有害性クラスを「情報なし(専門家判断)」として、予審・本審の判断を仰ぐことにした。

以上の類似物質候補の評価案に基づく毒性項目毎の有害性クラスを表 1 に示す。類似物質候補の評価終了時点における本検討の対象であるジイソブチルヘキサノエートの類推による有害性クラス案は、一般毒性「外」、生殖発生毒性「4 または外」、遺伝毒性「外」、発がん性「情報なし」とするのが良いと考えられた。これらの有害性クラスについては、以降の代謝物の評価結果を踏まえて再考することとする。

1-2. 代謝物の毒性評価

ECHA dossier の情報は事業者による登録情報であり、行政側による有害性評価が行われていないものであるが、類似物質候補

である CAS. 105-99-7 Dibutyl adipate の有害性情報検索の過程で、ECHA のデータベースからグルーピング (The PFAE Linear (Polyfunctional Aliphatic Ester) category : PFAE 直鎖 (多官能脂肪族エステル) カテゴリー) の情報が得られた (<https://www.echa.europa.eu/web/guest/registration-dossier/-/registered-dossier/5939/7/2/1>)。この情報によると、このカテゴリーには本検討で類似物質候補とした CAS. 105-99-7 Dibutyl adipate, CAS. 103-23-2 Diethylhexyl adipate, CAS. 6938-94-9 Diisopropyl adipate が含まれていた。このカテゴリーの特徴については、一般的なジカルボン酸 (アジピン酸 (C6)、アゼライン酸 (C9)、セバシン酸 (C10)) のジエステル誘導体であり、ジエステルのアルコール部分には、通常、直鎖または分岐した C3 ~ C20 の炭素数範囲のアルコールを含んでいることとされていた。また、すべてのカテゴリー構成物質は、アルコールとそれぞれのジカルボン酸のエステル化によって生成されるが、エステル化は原則として可逆反応 (加水分解) であるため、アルコールとジカルボン酸部分は、カテゴリメンバーの前駆物質であると同時に分解生成物でもあるとの説明があった。

昨年度実施した OECD QSAR Toolbox による代謝物予測において、ジイソブチル=ヘキサジオアートや類似物質候補 6 物質は、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。

これらの情報を踏まえると、ジイソブチル=ヘキサジオアートが代謝された場合、アジピン酸 (CAS. 124-04-9) とイソブタノール (CAS. 78-83-1) が生成されることが考えられる。そこで、各々の代謝物についての毒性についても評価することとした。

化審法での過去の評価状況を確認した結果、いずれの物質についてもスクリーニング評価が 2023 年度または 2024 年度に終了 (本審済み) であった。そのため、本検討ではこの評価結果を活用することとし、必要に応じて評価内容を見直した。以下、各代

謝物のスクリーニング評価結果の概要を示す。

1) アジピン酸

一般毒性は、OECD SIDS (2006)、US EPA HPV-IS (2008) が情報源であったラット 2 年間混餌投与試験 (Horn et al. 1957) をキースタディとして採用していた。この試験では、雄に最高 5%、雌に 1% の用量でアジピン酸を投与した結果、雄の 3% 以上の群に体重増加抑制がみられたことを根拠に、NOAEL 1% (US EPA HPV-IS による換算では 280 mg/kg bw/day) と判断し、不確実係数積 100 で除した 2.8 mg/kg bw/day を有害性評価値としていた。その結果、有害性クラスが「外」となった。

生殖発生毒性については、一般毒性試験での生殖器への影響や発生毒性試験結果のみで経世代影響を検索した生殖発生毒性試験の情報が無かったこと、発生毒性試験も高用量の試験結果がなく評価できなかったことから、評価できず「情報なし」となっていた。なお、生殖器への毒性影響や発生毒性は、得られたいずれの試験情報においても認められなかった。

遺伝毒性については、Ames 試験、*in vitro* 染色体異常試験、その他の *in vitro* 試験 (Hprt 試験、マウスリンフォーマアッセイ)、*in vivo* 染色体異常試験がいずれも陰性であったため、有害性クラスが「外」であった。

発がん性については、IARC 等の評価機関による発がん性分類情報が無く、「情報なし」であった。

2) イソブタノール

一般毒性については、EPA IRIS が設定した Reference Dose (RfD) 0.3 mg/kg/day を採用し、有害性クラスは「4」であった。RfD の根拠は、ラット 13 週間反復経口投与試験 (US EPA, 1986) であり、最高 1000 mg/kg/day の用量でイソブタノールを投与した結果、1000 mg/kg/day で投与初期にみられた軽度の体重増加抑制、活動量低下や試験期間を

通してみられた運動失調、血清中カリウム濃度低値がみられたため、NOEL 316 mg/kg/day と判断された。RfD は、NOEL を不確実係数積 1000（種差 10、個体差 10、試験期間 10）で除した値となる。その他にも複数の経口または吸入の試験があったが、RfD 由来の上記評価値が最小であった。

生殖発生毒性については、ウサギ発生毒性試験 (BASF, 1990)において妊娠 7-19 日目に最高 10,000 mg/m³ を吸入暴露した母動物の妊娠期間中にみられた軽度の体重増加抑制を根拠に、NOAEL 2500mg/m³ (227 mg/kg/day に相当)と判断され、不確実係数積 1000（種差 10、個体差 10、試験の質 10）で除した 0.23 mg/kg/day が有害性評価値となっていた。その結果、有害性クラスが「4」となった。本検討において、ウサギ発生毒性試験にみられた母動物の体重増加抑制について、得られた有害性情報を再確認し、さらに原著に遡って確認した結果、この体重増加抑制には統計学的有意差や用量依存性がないことが確認できたため、毒性影響ではないと考えられた。したがって、当該試験の母動物の NOAEL を見直し、最高用量の 10,000 mg/m³ として上記の通りの不確実係数積を適用して求めた D 値 0.91 mg/kg/day に基づく有害性クラス「外」を最終的な評価結果とすることとした。なお、本物質についてはラットを用いた吸入経路による 2 世代試験の情報があり、2,500 ppm (7,580 mg/m³) までの用量で親動物及び児動物共に生殖発生毒性は認められていない。また、この 2 世代試験の有害性評価値は、前述の発生試験毒性のものより高値であったため、発生毒性試験の結果を採用した。

遺伝毒性については、Ames 試験、*in vitro* 染色体異常試験、その他の *in vitro* 試験（小核試験、Hprt 試験、マウスリンフォーマアッセイ）、*in vivo* 小核試験がいずれも陰性であったため、有害性クラスが「外」であった。

発がん性については、IARC 等の評価機関による発がん性分類情報が無く、「情報なし」であった。

1-3. 類似物質候補の代謝物の毒性評価 1) 1-ブタノール

CAS. 105-99-7 Dibutyl adipate は、代謝されるとアジピン酸と CAS. 71-36-3 1-ブタノールに分解する。化審法では、1-ブタノールは評価 I 対象となっており、既に評価が終了しているため、以下にその概要を示す。

一般毒性については、EPA IRIS が設定した RfD 0.1 mg/kg/day を採用し、有害性クラス「4」であった。RfD の根拠試験は、ラットを用いた 13 週間反復強制経口投与試験 (EPA, 1986) であった。この試験では、雌雄ラットにブタノールを最高 500 mg/kg/day の用量で投与した結果、投与期間の最後の 6 週間に 500 mg/kg/day 群の雌雄に運動失調及び運動機能の低下が認められたことから、NOAEL 125mg/kg/day と判断され、不確実係数積 1000（種差 10、個体差 10、試験期間の不足 10）で除した値 0.1 mg/kg/day が RfD として設定されていた。この評価において参照した食品安全委員会の評価 (2005)では、雌の高用量群で観察された運動失調等については、投与の 2～3 分後に発現し、1 時間以内に消失したが、症状が出現した 7 週目以降も継続して認められていることから、投与に関連する毒性と考え評価されていた。

生殖発生毒性については、食品安全委員会 (2005)及び環境省リスク評価 (2005)に採用されていたラットを用いた発生毒性試験 (Ema et al. 2005)がキースタディとして採用されていた。ラットの妊娠 0-20 日に、1-ブタノールを最高 5,654 mg/kg/day の用量で飲水投与した結果、5,654 mg/kg/day 群の母動物に摂餌量及び飲水量の減少を伴った体重増加の有意な抑制を、同群の胎児に低体重、過剰肋骨、前肢基部趾骨の骨化遅延の発生率の有意な増加を認めたことから、NOAEL は 1,454 mg/kg/day と判断され、不確実係数積 1000（種差 10、個体差 10、試験の質 10）で除した 1.454 mg/kg/day を有害性評価値としていた。その結果、有害性クラスは「外」となった。上記キースタディでは経

世代影響を評価できていないが、本物質に関する経世代試験 (Nelson et al. 1989) を根拠とした NOAEL や有害性評価値はキースタディとした発生毒性試験の各値より高値であったため、発生毒性試験がキースタディに採用されていた。また、本物質の高用量投与により胎児に認められた所見は、母動物の影響 (体重増加抑制等) による二次的な影響であると考えられ、本物質による深刻な発生毒性ではないと考えられた。

遺伝毒性については、Ames 試験陰性、*in vitro* 染色体異常試験陰性、*in vitro* 小核試験及び *Hprt* 試験陰性、*in vivo* 小核試験陰性であったため、有害性クラスが「外」となった。

発がん性については、US EPA が D (Not classifiable as to human carcinogenicity) と評価していたものの、他機関は分類結果を出していなかったため、「情報なし」となった。

2) 2-プロパノール

CAS. 6938-94-9 Diisopropyl adipate は、代謝されるとアジピン酸と CAS. 67-63-0 2-プロパノールに分解する。化審法では、2-プロパノールは評価 I 対象となっており、既に評価が終了しているため、以下にその概要を示す。

一般毒性については、OECD SIDS (1997) に記載があったラット 13 週間反復投与試験 (吸入) (Burleigh-Flayer, H.D., et al., 1994) をキースタディに選定していた。最高 5000 ppm の 2-プロパノールを 1 日 6 時間、週 5 日、13 週間暴露した結果、1500 ppm 以上で麻酔作用が、5000 ppm で運動失調、体重減少 (1 週目のみ) が認められたため、NOAEL 500 ppm (166 mg/kg/day に相当) と判断され、不確実係数積 200 (種差 10、個体差 10、試験期間の不足 2) で除した 0.83 mg/kg/day を有害性評価値としていた。その結果、有害性クラスが「外」となった。

生殖発生毒性については、OECD SIDS (1997) に記載があったウサギ発生毒性試験をキースタディとして採用していた。2-プロパノールを最高 480 mg/kg/day の用量で

妊娠 6-18 日に強制経口投与した結果、480 mg/kg/day で母動物の死亡、体重増加抑制、臨床症状が認められたことを根拠に NOAEL 240 mg/kg/day と判断され、不確実係数積 1000 (種差 10、個体差 10、試験の質 10) で除した 0.24 mg/kg/day を有害性評価値としていた。その結果、有害性クラスが「4」となった。この試験で母動物に認められた所見は、いずれも一般毒性に相当するものであるが、妊娠中にみられた所見であるため、母動物の内分泌系の変化が影響している可能性があることを考慮し、生殖毒性のエンドポイントとして採用していた。しかし、本検討のために生殖発生毒性に関する有害性情報を見直した結果、上記のウサギ発生毒性試験に関する環境省のリスク評価書の記載において、480 mg/kg/day 群の母動物には、飲酒時にみられるような耳の紅潮、耳の末梢血管の破裂やチアノーゼ、喘ぎ、下痢なども数匹にみられたとされていた。したがって、母動物の死亡や体重増加抑制等は、アルコールによる一般毒性影響であり、ウサギだからあるいは妊娠により感受性が高まった可能性があると考えられた。また、同群では、着床前/着床後胚損失や胎仔の性比、数や体重などに影響はなく、奇形の発生増加もみられなかったことから、本試験の真の生殖発生毒性に関する NOAEL は、最高用量の 480 mg/kg/day であると考えられた。この評価結果を新たに採用し、改めて得られた全ての生殖発生毒性試験について確認した結果、キースタディはラットの 2 世代生殖発生毒性試験が妥当であり、NOAEL に相当する BMDL₁₀ (OECD SIDS が導出) 407 mg/kg/day を基点に不確実係数積 100 で除した 4.1 mg/kg/day が D 値となり、有害性クラスは「外」となった。なお、得られた各種の生殖発生試験情報から、非常に高い用量 (1000 mg/kg/day 以上) の本物質投与により、雄の生殖能低下や母動物の不妊、全胚吸収、児動物の生後体重の低値、胎児体重の低値、骨格奇形を、500 mg/kg/day では 2 世代生殖発生毒性試験での F1, F2 の生後

生存率の低値を誘発することが確認されている。

遺伝毒性については、Ames 試験陰性、*in vitro* 小核試験及び *Hprt* 試験陰性、*in vivo* 小核試験陰性、*in vivo* 染色体異常試験（骨髄）陽性であったが、食品安全委員会では陽性となった *in vivo* 染色体異常試験は、用量等の詳細が報告されておらず、評価の対象とすることはできないと判断しており、本物質に遺伝毒性はないとしていたため、有害性クラスは「外」であった。

発がん性については、IARC 3、ACGIH A4、GHS 分類できない、とされていたことから、「情報なし」であった。

3) 2-エチルヘキサノール

新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) による CAS. 103-23-1 Diethylhexyl adipate の有害性評価書 (https://www.chem-info.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/hazard/hyokasyo/No-84.pdf) によると、アジピン酸ビス(2-エチルヘキシル)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た後、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に代謝され、尿中排泄される。2-エチルヘキサノールはグルクロン酸抱合されるか、2-エチルヘキサン酸へと代謝された後にグルクロン酸抱合を受け、尿中排泄される。2-エチルヘキサノール(CAS. 104-76-7 別名 2-エチルヘキサン-1-オール)は、化審法ではスクリーニング評価対象となっており、2023 年度に評価が終了していた。以下にその概要を示す。

一般毒性については、JECFA, AUNICNAS, 産衛学会, MAK, Patty, ECHA が採用していたラットを用いた 2 年間強制経口投与試験 (Astill et al., 1996) をキースタディとしていた。この試験では、雌雄ラットに最高 500 mg/kg/day の用量で 2-エチルヘキサノールを投与した結果、150 mg/kg/day で雌雄に体重増加抑制、全身状態の悪化、呼吸困

難、立毛および/または尿による被毛の汚れ、最高用量群で雌の死亡率の高値や雌雄の体重増加抑制が認められたことから、NOAEL は 50 mg/kg/day と判断され、不確実係数積 100 (種差 10、個体差 10) で除した 0.36 mg/kg/day が有害性評価値となり、有害性クラスは「4」となった。

生殖発生毒性については、発生毒性及び一般毒性試験での生殖器への影響しか評価できず、経世代の影響を評価できていないことから「情報なし」であった。しかし、得られた発生毒性試験について確認した結果、強制経口投与によるラット発生毒性試験 (Hellwig et al. 1997) において、1300 mg/kg/day で母動物に死亡、体重増加抑制、臨床症状等が、胎児に吸収胚数の増加による着床後胎児死亡数の増加、平均体重の減少、腎盂拡張および/または水尿管の発生率増加、骨格奇形を示す胎児数の増加等が認められ、650 mg/kg/day では母動物の 2/10 例に立毛が認められただけにも関わらず、胎児では平均体重 (総生存胎児及び雄胎児) のわずかな減少、骨格変異および発育遅延の統計的に有意な増加が認められた。AUNICNAS ではこの試験結果に基づき、本物質は発生毒性物質であるとしていた。スクリーニング評価では、前述の通り経世代の影響を評価できていない場合は「情報なし」とするが、本物質の発生毒性を考慮し、仮の評価結果を導出した場合、上記試験の NOAEL 130 mg/kg/day を不確実係数積 1000 (種差 10、個体差 10、試験の質 10) で除した 0.13 mg/kg/day が有害性評価値となり、有害性クラスは「4」となる。

遺伝毒性は、Ames 試験、*in vitro* 染色体異常試験、MLA 試験、*Hprt* 試験、*in vivo* 小核試験、優性致死試験、*in vivo* 染色体異常試験いずれにおいても陰性であったため、有害性クラスは「外」であった。

発がん性については、各機関にて定性的評価が行われていなかったため、「情報なし」であった。

1-4. RA によるジイソブチル＝ヘキサンジオアートの有害性クラス提案

スクリーニング評価の最終目的は、各毒性項目の有害性クラスを付し、その中で最も高い(毒性影響が強いこと示す)有害性クラスを、評価対象物質を代表する有害性クラスとして選定することである。したがって、スクリーニング評価のための RA を活用した評価では、各毒性項目の有害性クラスの類推を目的にすることが妥当であると考えた。

ジイソブチル＝ヘキサンジオアートの代謝物、類似物質候補及びその代謝物の評価結果(表 2~表 5)をまとめ、本物質の各毒性項目に関する妥当と考えられる有害性クラスを検討した。

一般毒性について、ジイソブチル＝ヘキサンジオアート及び全ての類似物質候補の代謝物であるアルコール類に、臨床症状が認められた。これらの症状は、類似物質候補やアジピン酸によっては誘発されていないことから、アルコール特異的な影響であると考えられた。また、類似物質候補やアジピン酸の一般毒性試験では、毒性影響が認められないか、体重増加抑制が認められているだけであった。したがって、3つの類似物質候補の一般毒性は、代謝物のアルコール類の影響を受けず、臓器特異的な毒性影響を誘発しない特性があると考えられた。各類似物質候補の一般毒性の有害性クラスは、いずれも「外」であったことから、ジイソブチル＝ヘキサンジオアートの一般毒性の有害性クラスは「外」とするのが妥当であると考えられた。

生殖発生毒性について、CAS. 105-99-7 Dibutyl adipate そのものの生殖発生毒性スクリーニング試験では毒性影響を認めず、代謝物であるアジピン酸は経世代影響を確認できなかったものの発生毒性は認めず、1-ブタノールは母動物、胎児ともに影響が認められたものの、胎児にみられた影響は母動物の体重増加抑制等による二次的影響であると考えられ、真の発生毒性とは言え

ないことが考えられた。CAS. 6938-94-9 Diisopropyl adipate については、そのものに関する生殖発生毒性については十分な情報がなく評価できなかったが、代謝物のアジピン酸については生殖器への影響や発生毒性は認めず、2-プロパノールについては2世代生殖発生毒性試験で F1, F2 の生後生存率低下、生後 0 日の体重低値、F2 雄の生殖能指数低値が認められたものの、有害性クラスは「外」であった。他の類似物質候補の生殖発生毒性は、代謝物であるアルコール類の有害性クラスと同じである傾向が認められることから、本物質の生殖発生毒性の有害性クラスは「外」である可能性が高いと考えた。CAS. 103-23-1 Diethylhexyl adipate の生殖発生毒性については、代謝物の 2-エチルヘキサノールと共に有害性クラス「4」であった。両物質に認められた発生毒性に関する所見から、Diethylhexyl adipate の生殖発生毒性は 2-エチルヘキサノールに起因する可能性があると考えた。2-エチルヘキサノールはさらに代謝されて 2-エチルヘキサン酸となるが、この物質は AU NICNAS 等が発生毒性物質としており、Pennanen ら (1992) によるラット発生毒性試験では、母動物の NOAEL より低い用量で胎児に波状肋骨の発生率の有意な増加等が認められることが確認されている。これらを踏まえると、Diethylhexyl adipate の発生毒性は代謝物の 2-エチルヘキサノールや 2-エチルヘキサン酸に起因する可能性が高く、これが、明らかな発生毒性が認められない他の類似物質候補(前述)とは異なる理由であると考えられた。

以上の類似物質候補及びその代謝物の生殖発生毒性や、ジイソブチル＝ヘキサンジオアートのアルコール代謝物であるイソブタノールに生殖発生毒性がないことを踏まえると、ジイソブチル＝ヘキサンジオアートが懸念すべき顕著な生殖発生毒性を生じる可能性は低く、有害性クラスが 3 以上にはならないと考えられた。本検討の結果から、ジイソブチル＝ヘキサンジオアート

の代謝物に生殖発生毒性はない可能性が高いと考え、最終的に有害性クラスは「外」とすることを提案し、今後行う予審・本審にて委員の意見に基づき確定することとした。

遺伝毒性は、類似物質候補及びその代謝物のほとんどの有害性クラスは「外」であった。CAS. 6938-94-9 Diisopropyl adipate の遺伝毒性は情報がなく評価できない状況であったが、代謝物や他の類似物質候補が全て「外」であったことから、Diisopropyl adipate の遺伝毒性の有害性クラスは「外」とするのが妥当であると考えた。以上を踏まえると、本検討の評価対象であるジイソブチル＝ヘキサジオアートの遺伝毒性の有害性クラスも「外」とするのが妥当であると考えた。

発がん性については、今回検討した全ての類似物質候補や代謝物は「情報なし」であったため、ジイソブチル＝ヘキサジオアートの発がん性についても「情報なし」となる。

以上をまとめると、ジイソブチル＝ヘキサジオアートの各毒性項目に関する有害性クラス（案）は、表 6 の通りとなる。

2. ノナンー 1－オール

2－1. 類似物質候補のスクリーニング評価

C5～C22 の類似物質候補について、各物質に関する有害性情報に基づき、4 つの毒性項目（一般毒性、生殖発生毒性、遺伝毒性、発がん性）を評価し、個別シートを作成した。通常のスクリーニング評価では、得られた有害性情報に評価対象物質の構造類似物質に関する毒性試験情報が記載されている場合は、その情報も個別シートに転載し評価の参考にすることがあるが、本検討においては、各個別シートには各類似物質候補そのものに関する毒性試験情報のみを収集し、評価することとした。各類似物質候補については、評価結果に基づき 4 つの毒性項目の有害性クラス案を付し、評価案を作成した。通常のスクリーニング評価では、一般

毒性や遺伝毒性（Ames 試験及び *in vitro* 染色体異常試験）の情報が十分ではなく評価できない場合は、評価不能（評価保留）となるが、本検討では、これらの毒性項目・毒性試験の情報が十分なくても、その結果を反映した個別シートを作成することとした。

この段階での各類似物質候補の有害性クラス案を表 7 に示す。

2－2. 類似物質候補の有害性クラスに基づくノナンー 1－オール等の有害性クラス類推

類似物質候補の評価結果及び有害性クラス案を確定させた上で、ノナンー 1－オール等の有害性クラスの類推を試みた。表 7 に示した通り、本検討の対象物質としたノナンー 1－オール及びデカンー 1－オールについては、炭素鎖長の異なる類似物質候補の評価結果による挟み込みにより、各毒性項目の有害性クラスを類推可能であると考えた。また、類似物質候補とした物質の中に、一部または全ての毒性項目についての有害性情報がないため評価できず「情報なし（有害性クラス付与不可）」となった物質があったが、それらについても他の類似物質候補の評価結果に基づく挟み込みで有害性クラスを付することができる（グループ評価できる）と考えた。

有害性クラスの類推を行うにあたり、各類似物質候補の個別シートを改めて見直し、毒性所見の特徴を精査した。この精査は、有害性クラスのみに着目し類推を行うと、類似物質候補間の毒性所見の相違点を見落としたまま有害性クラスを類推することになってしまうことから、グループ評価においては毒性所見の類似性を最終確認するために必要なプロセスであると考えた。

各類似物質候補の個別シートを見直した結果、いずれの物質についても、一般毒性については臓器特異的な毒性所見は認められず、生殖発生毒性については親動物の生殖能や胎児/児動物への発生・発達への影響は認められず、遺伝毒性については全ての

試験結果が陰性であり、遺伝毒性を有する可能性はないと言えることを確認することができた。したがって、有害性情報が得られた類似物質候補については、いずれの毒性項目についても人健康影響に類似性があると考えられた。また、この検討では類似物質候補の有害性クラスのみに着目して類推することが可能と判断した。

2-3. 類似物質候補の物理化学的性状に基づくサブグループ化の必要性検討

RA による評価あるいはグループ評価を行う場合は、類似物質候補の化学構造及び毒性影響の類似性だけでなく、暴露や体内動態に影響を与える物理化学的性状の類似性についても検討する必要があると言われる。そこで、C5~C22 の物理化学的性状を Pubchem や US EPA の ChemDashboard を活用して調査した。このとき、オクタノール-水分配係数、水溶性、蒸気圧、物理的状态、大気中に放出された場合の蒸気圧を考慮した物理的状态、密度、粘度について調査した。

その結果、炭素鎖長が短いものは液体として存在するが、炭素鎖が長くなるにつれ (C12~) 徐々に粘土が増し、C16 より長い炭素鎖長のものは固体として存在することが確認できた。また、大気中での物理的状态も、C14 までは蒸気として存在するが、C16 より長い炭素鎖を有するものは蒸気及び粒子として存在するようになることを確認できた。以上のことから、本検討での類似物質候補のグループ評価においては、物理化学的性状を考慮し、少なくとも C16 前後でサブグループ化する必要がある可能性が示唆された。

2-4. 予審・本審の進め方の検討

以上の評価・検討結果をどのように予審・本審にて審査するかの方法を検討した。個別物質の評価において「情報なし」のため有害性クラスを付すことができなかった毒性項目について、有害性クラスを付すこと

ができた他の類似物質候補の評価結果から類推し確定するためには、まずは個別シートに示した各類似物質候補の評価案と有害性クラスを確定することが必要だと考えた。そこで、2-1. で作成した類似物質候補の全ての個別シートを予審・本審に回した。その結果、各類似物質候補の付すことができた各毒性項目の有害性クラスは、表 7 に示した当初の案の通りが妥当であると判断された。

次に、「情報なし」とした毒性項目の有害性クラスを、長短の炭素鎖長の類似物質候補の有害性クラスから挟み込みで類推した評価案を、表 8 の通り作成し、本審のみに回すこととした。その際は、先の予審・本審で評価内容が確定した各類似物質候補の個別シート及び物理化学的性状データを参考資料として提供した。その結果、類推による有害性クラス案は妥当であると判断された。また、物理化学的性状に基づくサブグループ化の必要性については、本審委員からの意見はなく、毒性影響についてはサブグループ化の必要性はないと考えられた。この本審の結果を受けて、C5~C22 の直鎖アルコール類の類推による有害性クラスを表 8 の通り付与し完了することができた。

2-5. RA によるスクリーニング評価における生殖発生毒性の評価方針について

通常のスクリーニング評価において、生殖発生毒性について、「生殖発生毒性の有害性データは、生殖毒性試験と発生毒性試験に分けて収集を行い、どちらのデータも得られた場合のみ有害性クラスを付与する。どちらかのデータしか得られない場合、もしくは、どちらのデータも得られない場合は「情報なし」とする。」とされている(「化審法における 人健康影響に関する有害性データの信頼性評価等について【改訂第2版】」より)。つまり、発生毒性試験しか情報が無い場合は、それらの試験結果について評価するものの、有害性クラスは付すことができず「情報なし」となる。しかし、発生

毒性試験しかない物質の中には、重篤な発生毒性（催奇形性含む）を誘発することが知られる場合があるため、上記のスクリーニング評価の方針では、このような発生毒性（催奇形性含む）を無視した評価結果を出すことになってしまう。

そこで、C5~C22 の直鎖アルコールに関するグループ評価では、通常の評価方法で生殖発生毒性について「情報なし」となった物質について、発生毒性試験しなく「情報なし」となった物質を抽出し、その試験結果について精査し、有害性クラス付けのために考慮すべき所見の有無を確認した。その結果、C6 と C8 は発生毒性試験のみで「情報なし」となっていたため、得られた各発生毒性試験で認められた所見や試験の妥当性を精査した。

C6（1-ヘキサノール）については、経口の発生毒性試験に基づき仮に有害性クラスを付した場合「4」となるが、その試験情報の信頼性が低いことが確認されたため、この結果は不採用にすべきと判断した。また、吸入の1用量のみで実施した発生毒性試験があり、通常のスクリーニング評価では用量反応関係の評価できないとして不採用とするが、比較的高用量（756 mg/m³）でも毒性影響が認められていないことから、この試験結果を採用し、本検討におけるグループ評価での有害性クラス「外」相当（懸念すべき発生毒性は無し）として扱うこととした。ただし、通常のスクリーニング評価の考え方に倣った場合は「情報なし」として扱う。

C8（1-オクタノール）については、経口と吸入の各1試験の発生毒性試験の情報しか得られず、「情報なし」としていたが、これら発生毒性試験について仮に有害性クラスを付すと「4」となるため、各試験について精査した。経口の試験では、妊娠母動物に体重増加抑制、摂餌量低下、臨床症状（側臥位または腹臥位、立毛、不安定歩行等）が認められた。これらの所見の種類としては一般毒性に該当するが、通常のスクリーニン

グ評価では妊娠による影響の可能性を否定できないことから、母動物への影響と見なして評価する。しかしながら、本検討ではグループ評価を行うために原著データまで遡って確認し、各所見が毒性影響あるいは真の生殖発生毒性影響かを見極めた。結果的に、体重と摂餌量の変化に有意差はなく、臨床症状はアルコールによる一般毒性であり、いずれの変化も妊娠の維持や胎児の発生・発達に影響するものではないと判断した。吸入の発生毒性試験については、C8の物理化学的性状の問題から最大 400 mg/m³ (86.7 mg/kg/day 相当)しか暴露できないため、十分に毒性影響を評価できる試験とは言えないと判断し、本評価では参考扱いにした。C8の有害性クラスについても、発生毒性の情報しか得られなかったため通常の評価の考え方に倣って「情報なし」となるが、本検討でのグループ評価においては、経口試験の発生毒性の有無に基づき評価し、クラス「外」相当と扱うこととした。

これらの発生毒性に関する精査結果は、本審委員の確認を経て最終化した。発生毒性の精査の結果、前述の類推による生殖発生毒性の有害性クラスに変更の必要性はないと判断された。

D. 考察

以上の通り、本検討では、ジイソブチル＝ヘキサンジオアート及びノナン-1-オールを対象にしたケーススタディにより、有害性クラスの類推を試みた。「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」の検討結果に基づき、同様の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）を以下の通り提案する。

①毒性プロファイルの把握、類似物質候補の検索

OECD QSAR Toolbox 等の利用可能なツールを活用し、そのプロファイリング機能

で評価対象物質が有する可能性がある毒性学的特徴を確認する。また、構造類似物質を検索し、毒性プロファイルの共通性や構造類似性、CAS 番号の有無、有害性情報の有無等に基づき、類似物質候補を絞り込み選定する。類似物質候補の検索については、OECD QSAR Toolbox から得られる情報の他に、Pubchem や OECD SIDS 等の他の機関によるカテゴリー評価の結果があれば、それらを参照することもできる。この段階では、類似性が妥当であるかに関わらず、幅広く類似物質候補を選ぶ。

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

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/>)や欧州化学機関 (European Chemicals Agency, ECHA) による公開データベース

(<https://echa.europa.eu/information-on-chemicals>)、US EPA による CompTox Chemicals Dashboard

(<https://comptox.epa.gov/dashboard/>)を活用して、類似物質候補の分子量や物理化学的性状を調査する。また、有害性については、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) や OECD QSAR Toolbox から得られる有害性情報を収集する。体内動態については、入手できた有害性情報（国内外のリスク評価機関が公表している評価資料等）を調査する。体内動態に関する情報を踏まえ、類似物質候補間で代謝物に共通性が認められる場合は、代謝物の有害性についても同様に情報収集する。

③類似物質候補等の有害性評価

入手できた各類似物質候補の有害性情報（毒性試験の結果等）は、スクリーニング

評価のために物質毎に用意された個別シート（様式）に整理する。各個別シートには、当該物質に関する情報のみを入力する。各物質について、一般毒性、生殖発生毒性、遺伝毒性、発がん性を「スクリーニング評価手法の詳細（案）」

(https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/information/ra/screening_detail.pdf)に倣って評価する。毒性項目毎に有害性クラスを付し、評価案を作成する。このとき、各毒性項目の情報が十分なくても、その状況を反映した個別シートを作成する。既にスクリーニング評価が終了している物質がある場合は、過去の評価結果（個別シート）を活用し、必要に応じて有害性情報の追加や評価内容の見直しを行う。

類似物質候補間で代謝物に共通性が認められる場合は、各類似物質候補の代謝物についても個別シートを作成し、評価する。この有害性評価の過程で、後に行う有害性クラス類推のために、各類似物質候補や代謝物の毒性所見の特徴を把握し、各物質による臓器特異的な毒性影響の有無や特定の類似物質候補による特異的な毒性影響の有無、あるいは毒性影響の共通性を確認する。また、生殖発生毒性について、発生毒性試験の結果しか得られなかった場合は、その試験結果を精査し、経世代影響を評価できないものの留意すべき発生毒性がないかを確認する。この確認の結果、通常のスクリーニング評価では生殖発生毒性の有害性クラスが「情報なし」となるところ、妊娠の維持や胎児の発生・発達への影響に基づき、有害性クラスを付す必要性を検討する。

④ 評価対象物質の類推による有害性クラス検討

③において付した類似物質候補（場合によっては代謝物も）に関する各毒性項目の有害性クラス案に基づき、評価対象物質の有害性クラスを類推できるか検討する。この過程で、必要に応じて③の評価結果を精査し、各有害性クラスの根拠が妥当かどうか

か再確認し、有害性クラス案を見直すこともある。炭素鎖長の異なる類似物質候補の評価結果に基づき評価対象物質の有害性クラスを類推する場合は、炭素鎖の長短の物質の評価結果から挟み込み(内挿)ができるかを検討する。また、類似物質候補間で代謝物に共通性が認められるケースの場合は、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クラス案に基づき多角的に評価対象物質の有害性クラスを類推できるかを検討する。

⑤ 有害性評価案の客観的評価(予審・本審)

④までの過程で、評価対象物質の有害性クラス案を用意することができたら、予審・本審に進める。この過程では、まずは類似物質候補(場合により代謝物も)に関する個別シートに示した各物質の評価案及び有害性クラス案の妥当性を委員に評価いただき、各物質の有害性クラスを確定する。次のステップで、確定した各物質の有害性クラスに基づく類推による評価対象物質の有害性クラス案の妥当性を評価いただく。このとき審査いただく資料は、前のステップで確定した各物質の有害性クラスと、それらの有害性クラスに基づく類推による評価対象物質の有害性クラス案を一覧できる表(例:本検討で示した各種表)を提示し、各物質の個別シートや物理化学的データ等は参考資料として提供する。委員からの意見で評価対象物質の類推による有害性クラス案の修正やサブグループ化の必要性が提案された場合は、その提案に基づき改めて有害性クラスを類推可能か検討する。

この進め方(案)は、あくまでも一研究者の検討結果に基づくものである。しかし、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、進め方は実用的であったと考える。一方、ジイソブチル=ヘキサ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。

E. 結論

本検討では、化審法のスクリーニング評価に活用することを前提とした独自のリードアクロス(RA)のあり方を提案することを目指し、2物質(ジイソブチル=ヘキサジオアート(CAS RN: 141-04-8))及びノナン-1-オール(CAS RN: 143-08-8)を対象としたケーススタディを実施した。各々のケースについてどのように有害性クラスを類推するべきかを検討した結果を踏まえ、「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。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

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.

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.

F-2. 学会発表

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 (2024.7.5)

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 (2024.7.5)

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

特になし

表 1：類似物質候補の各毒性項目の有害性クラスと類推によるジイソブチル＝ヘキサンジ
オアートの有害性クラス：類似物質候補の評価終了時点での案

CAS No.	Chemical name	一般毒性	生殖発生毒性	遺伝毒性	発がん性
105-99-7	Dibutyl adipate	外	外	外	情報なし
6938-94-9	Diisopropyl adipate	外	情報なし	情報なし	情報なし
141-04-8	Diisobutyl adipate	外	4 または外	外	情報なし
103-23-1	Diethylhexyl adipate	外	4	外	情報なし

表 2：ジイソブチル＝ヘキサンジオアートの代謝物の各毒性項目に関する有害性クラスと
その根拠となったエンドポイント

	アジピン酸	イソブタノール
一般毒性	外（体重増加抑制）	4（軽度の体重増加抑制、活動量低下等）
生殖発生毒性	情報なし（生殖器への影響や発生毒性は認めず）	外（生殖発生毒性影響なし）
遺伝毒性	外	外
発がん性	情報なし	情報なし

表 3 : CAS. 105-99-7 Dibutyl adipate 及びその代謝物の各毒性項目に関する有害性クラスとその根拠となったエンドポイント

	Dibutyl adipate	アジピン酸	1-ブタノール
一般毒性	外（最高用量で毒性影響なし）	外（体重増加抑制）	4（運動失調及び運動機能の低下）
生殖発生毒性	外（生殖発生毒性スクリーニング試験で、最高用量でも毒性影響なし）	情報なし（生殖器への影響や発生毒性は認めず）	外（母動物：摂餌量・飲水量の減少、体重増加抑制 胎仔：低体重、過剰肋骨、前肢基部趾骨の骨化遅延の発生率増加）
遺伝毒性	外	外	外
発がん性	情報なし	情報なし	情報なし

表 4 : CAS. 6938-94-9 Diisopropyl adipate 及びその代謝物の各毒性項目に関する有害性クラスとその根拠となったエンドポイント

	Diisopropyl adipate	アジピン酸	2-プロパノール
一般毒性	外(1000 mg/kg/day で毒性影響なし)	外（体重増加抑制）	外（麻酔作用、運動失調等）
生殖発生毒性	情報なし（「外」の可能性）	情報なし（生殖器への影響や発生毒性は認めず）	外（F1, F2 の生後生存率低下、生後 0 日の体重低値、F2 雄の生殖能指数低値）
遺伝毒性	情報なし	外	外
発がん性	情報なし	情報なし	情報なし

表 5 : CAS. 103-23-1Diethylhexyl adipate 及びその代謝物の各毒性項目に関する有害性クラスとその根拠となったエンドポイント

	Diethylhexyl adipate	アジピン酸	2-エチルヘキサノール
一般毒性	外（体重増加抑制）	外（体重増加抑制）	4（体重増加抑制、全身状態の悪化、呼吸困難等）
生殖発生毒性	4（胎児に化骨化減少、尿管の拡張、尿管のねじれ）	情報なし（生殖器への影響や発生毒性は認めず）	4（仮：発生毒性に基づく。母動物：死亡、体重増加抑制、臨床症状等、胎児：着床後胎児死亡数増加、平均体重減少、腎盂拡張および/または水尿管の発生率増加、骨格奇形等）
遺伝毒性	外（専門家判断）	外	外
発がん性	情報なし（専門家判断）	情報なし	情報なし

表 6 : ジイソブチル=ヘキサンジオアートの有害性クラス（最終案）

一般毒性	外
生殖発生毒性	外
遺伝毒性	外
発がん性	情報なし

表 7 : C5~C22 の直鎖アルコールに関する有害性クラス案

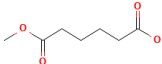
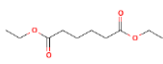
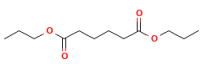
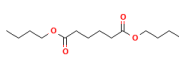
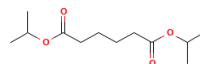
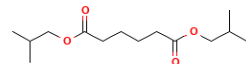
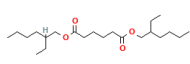
物質整理番号					有害性クラス			
CAS番号	優先通し番号	名称	炭素数	有害性クラス	一般毒性	生殖発生毒性	遺伝毒性	発がん性
71-41-0		1-ペンタノール	5	外	外	情報なし	外:専	情報なし
111-27-3		1-ヘキサノール	6	情報なし	外	情報なし	情報なし	情報なし
111-70-6		1-ヘプタノール	7	外	外	外	外	情報なし
111-87-5		1-オクタノール	8	情報なし	情報なし	情報なし	外:専	情報なし
143-08-8		ノナン-1-オール	9	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし
112-30-1	170	デカン-1-オール	10	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし
112-42-5		ウンデカン-1-オール	11	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし
112-53-8	171	ドデカン-1-オール	12	外	外	外	外	情報なし
112-70-9	171	トリデシルアルコール	13	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし
112-72-1	171	テトラデカン-1-オール	14	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし
629-76-5		ペンタデカン-1-オール	15	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし
36653-82-4		1-ヘキサデカンノール	16	情報なし	外	情報なし	情報なし	情報なし
1454-85-9		ヘプタデカン-1-オール□	17	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし
112-92-5		オクタデカン-1-オール	18	外	外	外	外	情報なし
1454-84-8		ノナデカン-1-オール	19	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし
629-96-9		イコサン-1-オール	20	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし
15594-90-8		ヘンイコサン-1-オール	21	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし
661-19-8		ドコサン-1-オール	22	外	外	外	外	情報なし

表 8：類推による有害性クラス付与案（黄色セル）

物質整理番号				有害性クラス				有害性クラス(RA)*			
CAS番号	優先通し番号	名称	炭素数	一般毒性	生殖発生毒性	遺伝毒性	発がん性	一般毒性	生殖発生毒性	遺伝毒性	発がん性
71-41-0		1-ペンタノール	5	外	情報なし	外:専	情報なし	外	情報なし	外:専	情報なし
111-27-3		1-ヘキサノール	6	外	情報なし	情報なし	情報なし	外	情報なし	外	情報なし
111-70-6		1-ヘプタノール	7	外	外	外	情報なし	外	外	外	情報なし
111-87-5		1-オクタノール	8	情報なし	情報なし	外:専	情報なし	外	外	外:専	情報なし
143-08-8		ノナン-1-オール	9	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	外	外	外	情報なし
112-30-1	170	デカン-1-オール	10	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	外	外	外	情報なし
112-42-5		ウンデカン-1-オール	11	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	外	外	外	情報なし
112-53-8	171	ドデカン-1-オール	12	外	外	外	情報なし	外	外	外	情報なし
112-70-9	171	トリデシルアルコール	13	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	外	外	外	情報なし
112-72-1	171	テトラデカン-1-オール	14	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	外	外	外	情報なし
629-76-5		ペンタデカン-1-オール	15	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	外	外	外	情報なし
36653-82-4		1-ヘキサデカンノール	16	外	情報なし	情報なし	情報なし	外	外	外	情報なし
1454-85-9		ヘプタデカン-1-オール□	17	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	外	外	外	情報なし
112-92-5		オクタデカン-1-オール	18	外	外	外	情報なし	外	外	外	情報なし
1454-84-8		ノナデカン-1-オール	19	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	外	外	外	情報なし
629-96-9		イコサン-1-オール	20	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	外	外	外	情報なし
15594-90-8		ヘンイコサン-1-オール	21	情報なし	情報なし	情報なし	情報なし	外	外	外	情報なし
661-19-8		ドコサン-1-オール	22	外	外	外	情報なし	外	外	外	情報なし

*類推した有害性クラス案（黄色セル）は、その後の本審において妥当性が認められた。

参考資料：ジイソブチル＝ヘキサジオアートの類似物質候補

	Dimethyl adipate	Diethyl adipate	Dipropyl adipate	Dibutyl adipate	Diisopropyl adipate	Diisobutyl adipate	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	調査対象物質	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))

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、TGR 試験から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。データ数は限られるものの、両者は概ね正の相関性を示す傾向がみられ、変異原性 BMDL₅₀ (mg/kg/day) を係数 100 で除すると発がん性 BMDL₁₀ を下回った。一方で、変異原性の強さ同士を比較するために、BMD の信頼区間 (BMDL-BMDU の範囲) を考慮した検討を行った結果、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。異なるエンドポイントの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が、変異原性 POD から発がん性 POD を推定するためには多くの不確実性要因を考慮する必要がある、中でも試験データをどのような条件で選択して定量的評価に利用するかが重要である。現在の変異原性試験は定性的評価のために使用されており、より精度の高い定量的評価に用いることができる試験設計を検討することも今後の課題と考える。

キーワード: TGR 試験、ベンチマークドーズ、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

In vivo 遺伝毒性試験の定量的評価と発がん性評価への利用を検討するため、トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験 (TGR試験) と発がん性の量的相関性を検討した。これまでに、肝発がん物質である *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) 、 *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) 、 2-

acetylaminofluoren (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、変異原性の定量的指標とし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。算出のためのソフトとしてPROAST webを使用した。計算にはモデル平均化 (model averaging) を採用し、benchmark response (BMR) またはcritical effect size (CES) の設定として0.5 (陰性対照値と比べて50%増加) を採用し、BMDL₅₀を算出した。変異原性PODと発がん性の強さを比較するため、発がん性については、carcinogenic potency database (CPDB)からマウスおよびラットの経口投与発がん試験の情報を収集し、肝臓を標的とした発がん性のPODとしてTD₅₀およびBMDL₁₀を算出した。変異原性PODと発がん性PODを比較し、量的相関性を検討した結果、正の相関を示す傾向がみられたことから、次に、相関性に影響する要因の検討を行った。発がん標的組織が異なるデータが相関性に与える影響を検討するため、腎臓を発がん標的とするアリストロキア酸のTGR試験データ (Chen et al. 2020) を加えた結果、正の相関傾向はあるものの、データのばらつきは大きくなった。さらに、投与経路や解析臓器が異なるTGR試験データとして遺伝毒性発がん物質12物質

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

について、TGR試験のPOD (BMDL₅₀) と発

がん性POD (BMDL₁₀) のデータを論文 (Chepelev et al. 2023) から取得し、両者の相関性を比較した。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。これらの結果から、試験データの不均一性と不確実性を考慮して、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。さらに、変異原性と発がん性の強さ (potency) 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検討した。遺伝毒性発がん物質12物質のBMDLとBMDUをプロットし、BMDの信頼区間を含めたpotencyの比較を行った。

(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

肝発がん物質においては変異原性POD (BMDL₅₀) と発がん性POD (TD₅₀) は概ね正の相関性を示したが、発がん標的や解析対象組織が異なる発がん物質のデータが混在すると、正の相関傾向はあるものの、ばらつきが大きくなる傾向がみられた。この傾向を検討するため、HESI GTTCの定量的解析グループの論文 (Chepelev et al. 2023) から遺伝毒性発がん物質12物質のTGR試験のPOD (BMDL₅₀) 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。発がん性PODとしてはBMDL₁₀を用いた。変異原性POD (BMDL₅₀) と発がん性POD (BMDL₁₀) を比較した結果、両者は概ね正の相関性を示した (図1)。変異原性BMDL₅₀ (mg/kg/day) を係数100で除すると発がん性BMDL₁₀を下回る傾向が見られた。さらに、変異原性の強さ同士の比較および発がん性の強さ同士の比較を行うためにBMDの信頼区間を考慮した検討を行った。変異原性と発がん性それぞれについて、信頼区間の下限であるBMDLに対して信頼区間の上限であるBMDUをグラフに片

側エラーバーとしてプロットした。変異原性については、 $BMDU_{50}/BMDL_{50}$ 比が100を超える物質が2物質（bap, nda）、10～100の物質が4物質（aaf, cbc, cpa, leu）あった。 $BMDL$ - $BMDU$ の範囲の重なりを考慮すると、遺伝毒性が強いグループ（but, cpa, aaf, cbc, leu, bap, nda）と弱いグループ（tce, ure, ben, cop, for）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、 $BMDU_{10}/BMDL_{10}$ 比が10を超える物質はなく、すべて5未満であった。発がん性 $BMDL$ - $BMDU$ の範囲の重なりを考慮すると、発がん性の強さは概ね $BMDL_{10}$ と相関しており、 $nda > cbc > cpa, bap > aaf > ure, ben > but, leu > for, tce, cop$ の順であった。変異原性 $BMDL_{50}$ （mg/kg/day）を係数100で除すると発がん性 $BMDL_{10}$ を下回る傾向がみられたのに対して、変異原性 $BMDU_{50}$ については係数100で除した場合でも発がん性 $BMDL_{10}$ を上回る傾向が3物質（nda, cbc, cpa）でみられた。これらはいずれも $BMDU_{50}/BMDL_{50}$ 比が10を超える物質であった。また、変異原性と発がん性が比較的強い物質グループであった。

D. 考察

遺伝毒性試験は発がん性物質のスクリーニング試験として広く使われているが、その目的は潜在的な発がん性の有無を予測する指標として遺伝毒性の有無を定性的に明らかにするものであり、すなわち遺伝毒性試験の結果は陽性または陰性として判定される。一方で、遺伝子突然変異は発がんのキーマークとして重要であり、変異原性試験の結果を定量的に解釈すること、さらに変異原性試験から発がん性の強さを予測することは遺伝毒性発がん物質の評価において取り組むべき課題の一つである。しかしながら、Ames試験を始めとした*in vitro*試験においては、S9mixを用いた代謝活性化が*in vivo*の代謝能を忠実に再現できないことや、対象組織における暴露濃度を反映した試験デザインの難しさなどから、定量的指標の

利用可能性には課題が多い。一方、*in vivo*変異原性試験であるTGR試験は、発がん試験と同様に反復投与で行われることが多い試験であり、任意の組織で突然変異頻度の解析が可能である。このことから、標的組織における変異原性の定量的評価、および発がん標的組織における変異原性と発がん性との比較に用いることができる利点がある。

これまでに、肝発がん物質を用いたTGR試験データから、変異原性の定量的指標としてBMD法による変異原性PODの導出を行った。発がん性の定量的指標としては TD_{50} および $BMDL_{10}$ が多く用いられるのに対して、変異原性PODとしては $BMDL_{50}$ （対象値から50%増加）が支持されており、本研究でもこれに倣った。 $BMDL_{50}$ の使用は、HESI GTTCやIWGTなどの国際的な遺伝毒性専門家の研究者グループによる検討と議論を経たものであり、現状においては*in vivo*変異原性試験に基づく変異原性PODとして使用できる可能性が高いと考えられる。本研究におけ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性PODを算出して、同じ標的臓器で変異原性POD（ $BMDL_{50}$ ）と発がん性POD（ TD_{50} , $BMDL_{10}$ ）を比較した結果、両者は概ね正の相関性を示した。また、変異原性POD（ $BMDL_{50}$ ）を係数100で除した値は発がん性POD（ TD_{50} ）を下回っていた。このことから、限られたデータではあるが、変異原性PODから発がん性PODを推定することで、変異原性試験から発がん性の強さを予測することができる可能性が示唆された。

TGR試験と発がん試験の大きな違いのひとつは、発がん試験が全身の組織を検索する試験であるのに対して、TGR試験では多くの場合2臓器、多くても4臓器程度を解析する試験であることである。すなわちTGR試験の解析は網羅的でなく、潜在的な発がん標的組織と異なる組織における変異原性データしか得られない可能性がある。この場合、非標的組織の変異原性の定量的指標

を用いて標的組織における発がん性の予測が可能かという問題がある。前述の遺伝毒性肝発がん物質を用いた検討においては発がん標的と変異原性の解析対象組織がともに肝臓だったが、この結果に、腎発がん物質のアリストロキア酸の腎臓における変異原性PODと発がん性PODを追加すると、正の相関性に対するデータのばらつきが大きくなる可能性が示唆された。変異原性の強さから発がん性の強さを予測する際には、精度を上げるために変異原性PODと発がん性PODの対象組織を一致させることに加えて、発がん標的臓器ごとに集計することが必要かもしれない。しかしながら、そのような方法は、発がん性不明の物質について変異原性試験の結果から定量的指標を導出して発がん性の強さを予測するというアプローチでは用いることができない。また、組織特異性の他に、TGR試験と発がん試験の大きな違いは投与期間である。TGR試験の投与期間はOECDテストガイドラインが推奨する28日間反復投与が多く使用されるが、それ以外の試験デザインも用いられる。一方、発がん性試験の投与期間は試験によって大きく異なるが、げっ歯類の試験では2年間などより長期の試験となる。投与期間が異なることによる変異原物質の曝露量の違い、また、初期キーイベントとしての遺伝子突然変異誘発と、有害性アウトカムとしての腫瘍発生の生じる時期の違いをどのように考慮するかは、定量的評価において重要な課題であるが、現時点で確立された手法はない。したがって、*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。その際は、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。

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では、変異原性POD (BMDL₅₀) と発がん性POD (BMDL₁₀) が概ね正の相関性を示すこと、変異原性POD (BMDL₅₀) を係数100で除した値が発がん性POD (BMDL₁₀) 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た発がん性の強さの予測の可能性を支持しているかもしれない。一方で、変異原性の強さ同士を比較するために、BMDの信頼区間 (BMDL-BMDUの範囲) を考慮した検討を行った結果、12物質は遺伝毒性が強いグループ (7物質) と弱いグループ (5物質) に大別されるものの、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。このことは、変異原性PODの比較から発がん性の強さの大小を予測することには限界があることを示している。原因として、TGR試験結果から算出したBMDにおいては12物質中6物質でBMDU₅₀/BMDL₅₀比が10を超えていたことが挙げられる。一方、発がん性PODについてはBMDU₁₀/BMDL₁₀比が10を超えていた物質はなく、個々の物質の発がん性の強さの順位付けも比較的容易であった。このことから、TGR試験から導出されたBMDの精度が十分ではないことが考えられる。TGR試験は、変異原性の有無を定性的に評価するために使用されており、現在の試験デザインが定量的評価に最適化されていないことは問題のひとつと考えられる。1群5匹で陰性対照群+3投与群を設定するデザインに対して、BMD解析のためには用量群を増やすことが有効との議論もある。3R推進の視点から使用動物数の削減が求められている中、定量的評価に適した試験デザインが模索されている。近年開発された *error-corrected* NGS (ecNGS) と呼ばれる次世代DNAシーケンサーを用いた遺伝子突然変異検出法は、反復投与毒性試験への組み込みなどが期待できることで注目が高いが、加えて、ecNGSでは突然変異頻度を測定した際に同一群内の個体差が小さい可能性が報告されている。そのような特徴を利用して、1群の動物数を減らしてその代わりに用量群を増やすなど、定量的解析に最適化し

た試験デザインが可能になるかもしれない。

近年、医薬品中のニトロソアミン不純物の管理においても、発がん性データのない変異原性物質のリスク評価のために*in vivo*変異原性試験データを利用できないかとの議論が始まっている。現在のICH M7ガイドラインではTGR試験データを発がん性の定量的リスク評価に利用することができないが、将来的な利用についてICH等の国際的な議論の場で継続的に検討されるものと考ええる。変異原性の量的指標をリスク評価に利用する議論を進めるために、変異原性PODと発がん性PODとの量的相関性に関する知見が蓄積されることが必要である。変異原性PODと発がん性PODの相関関係には多くの不確実性要因が含まれるため、精度の高い量的比較に用いるには限界がある。限られたデータ数ではあるが、変異原性PODを係数100で除した値が発がん性PODを下回るという本研究結果は、変異原性の量的評価と発がん性の予測への利用に示唆を与えるものと考ええる。

E. 結論

*In vivo*遺伝子突然変異試験の定量的指標の導出と発がん性との量的相関を検討するため、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BMDL₅₀ (mg/kg/day) を係数100で除すると発がん性BMDL₁₀を下回った。変異原性の強さ同士を比較するために、BMDの信頼区間 (BMDL-BMDUの範囲) を考慮した検討を行った結果、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。変異原性試験は定性的評価のために使用されており、より精度の高い定量的評価に用いることができる試験設計を検討することも今後の課題と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 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.
2. Iso T, Suzuki K, Murata Y, Hirose N, Umano 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.
3. 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.

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

該当なし

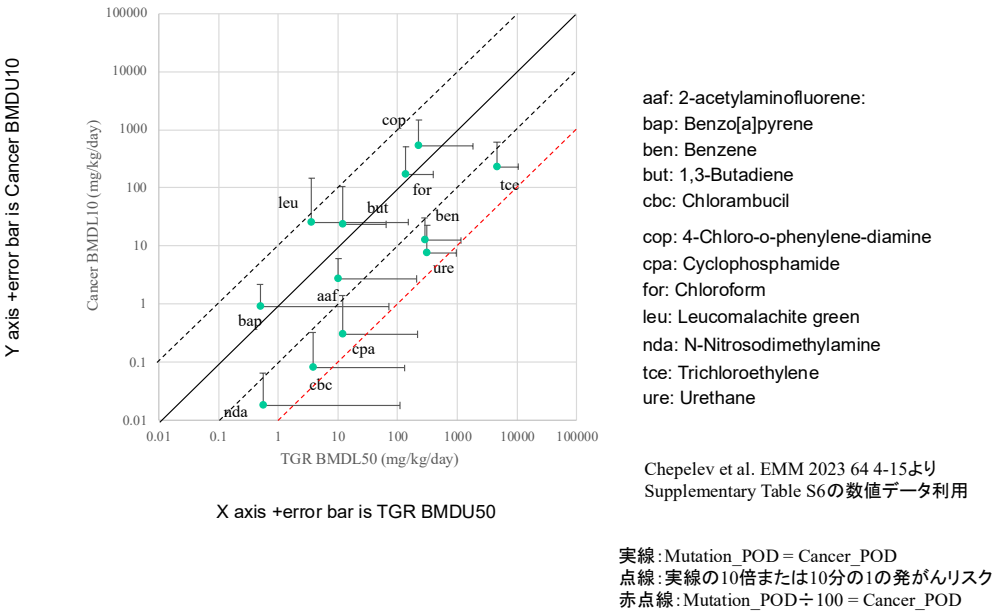
H-2. 実用新案登録

該当なし

H-3. その他

該当なし

図1：変異原性POD（BMDL₅₀）と発がん性POD（BMDL₁₀）の比較および信頼区間（BMDU-BMDLの範囲）の検討



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）
分担研究報告書

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

分担研究課題名：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

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 室長

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 部長

研究要旨

近年、in vitro 遺伝毒性試験のデータを基に発がん性を定量的に予測する手法の確立が強く求められている。こうした要請に応える新たな技術の一つとして、哺乳類細胞を用いた in vitro 試験に Data Independent Acquisition (DIA) 法によるトキシコプロテオミクスを統合するアプローチがある。本研究では、DIA トキシコプロテオミクスの実装可能性とその有用性を検証するため、遺伝毒性試験と組み合わせたプロテオーム解析を実施し、DNA 修復および DNA 損傷の応答に関連する生命活動に焦点を絞ってエンリッチメント解析を行った。本期間では、典型的な遺伝毒性物質であるシスプラチン処理した TK6 細胞から抽出されたタンパク質溶液について、一度の解析で 5000 以上のタンパク質を同定し、未処理群と比較して統計的有意差のあったタンパク質群について複数エンリッチメント解析した。その結果、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。しかしながら、そもそも使用された 0.5 および 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 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。

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 実験で発がん性物質や遺伝毒性物質に処理した細胞と未処理細胞を比較すると、形態学的には顕微鏡下で両者を識別することは困難な場合が多い。しかし、細胞内で進行している生命活動には顕著な差異が生じる。DNA 損

傷を受けた細胞では、生存維持のため DNA 修復や細胞周期停止などの防御応答が活性化され、一方で未処理の正常細胞では通常の細胞増殖や代謝といった恒常的プロセスが支配的である。このように外観上は類似していても、発がん性物質処理の有無によって細胞内機能動

態は大きく異なる。

両者の細胞をプロテオミクス解析し、そのタンパク質発現プロファイルを比較することで、この違いが定量的に可視化できる可能性がある。実際、プロテオミクスにより、遺伝毒性試験で陽性と判定された原因が、遺伝毒性作用だけでなく、酸化ストレスの発生という細胞毒性に起因している可能性が示唆された (Yasui et al., *Genes Environ* 43(1):7 (2021))。多くの遺伝毒性物質においても、プロテオーム上で DNA 修復などの生体防御反応の亢進が捉えられ、未処理細胞では平常時の細胞周期進行が示されるなら、細胞応答の状態を直接読み解く手法として極めて興味深いと考えられる。

発がんの初期段階では、化学的な DNA 損傷によって遺伝子変異が蓄積することが知られている。例えば、活性酸素種による酸化損傷ではグアニン塩基が 8-オキシグアニンに変化し、未修復のまま複製されると本来のシトシンではなくアデニンが対合されるため、G:C から T:A への置換変異が生じる。細胞はこうした塩基レベルの損傷に対処するため、DNA グリコシラーゼによる損傷塩基の除去に始まる塩基除去修復 (BER) 経路を活性化する。BER は酸化やアルキル化による小さな塩基損傷を修復する主要な機構であり、この経路が適切に機能すれば DNA 損傷は変異へと固定される前に除去される。このような遺伝毒性のスキームが存在することは広く認識されており、遺伝毒性および発がん性物質による初期変異誘発には DNA 付加体形成とそれに対する修復応答が重要である。

本研究では、新しい質量分析技術である DIA (Data-Independent Acquisition) 法を用いて、典型的な遺伝毒性物質であるシスプラチン进行处理した細胞に対して、細胞内タンパク質群を網羅的に同定・定量した。DIA 法はデータ非依存型の包括的プロテオミクス手法であり、1 回の

分析で 5000 種以上のタンパク質を一斉に検出可能な高い網羅性を有する。取得された大規模なプロテオミクスデータに対しては、機能的エンリッチメント解析を適用し、変動タンパク質群から特徴的な生物学的プロセスを抽出した。以上のアプローチによって、遺伝毒性や発がん性物質処理細胞と未処理細胞のプロテオームを比較し、それぞれの細胞内で亢進している生体機能を包括的かつ的確に明らかにすることを目指した。

B. 研究方法

1. 細胞培養およびシスプラチン処理方法

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% CO₂ 濃度存在下で行った。

プロテオミクスのためのシスプラチン処理方法は、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された。シスプラチンの用量設定方法は後述するが、プロテオミクスの処理では 0.5 および 1.5 µg/mL とした。処理時間は、0.5 および 4 hr とし、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 x 10⁵ cells) をサンプリングして、-80 度で保管した。

2. TK6 細胞を用いるチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験 (TK6 試験)

シスプラチン処理用量を設定するために、TK6 試験を実施した。その方法は OECD ガイドラインの TG490 (チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験) に従って実施した。用量は、1.5 µg/mL を最高用量とする公比 3、計 3 用量で試験された。シス

プラチンに対する TK6 細胞の相対生存率 (Relative survival; RS) と突然変異体頻度 (Mutant Frequency; MF) をそれぞれ測定した。未処理群およびシスプラチン処理群の MF の誘発性に関する有意差検定は、大森法 (Omori et al., Mutat. Res. 517,199-208 (2002)) の Dunnett 検定 (有意水準 $p < 0.05$) を用いた。

3. 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。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ル概要を示した。

4. プロテオミクスプロトコル

4-1) 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 μ L 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、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。

4-2) 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 μ 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 μ g 相当量を取り、

再び 0.1% Rapigest にて希釈し全量を 24 μ L にした。

4-3) 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 μ L に、1 μ 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 μ 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。

4-4) 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 μ L (0.25 μ g/ μ 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。

5. 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 μ 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。サンプルの必要量、最適なグラジエント組成、流速等の測定条件について様々な検討を行なった。

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/zs: Confidential

6. 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た。その際に KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) データベースを選択した。本研究では、DNA 修復、および DNA 損傷の応答に関係するジンオントロジー (GO) に焦点を当ててエンリッチメント解析を行った。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/>)。

- ・使用したソフトウェア: Scaffold DIA (Proteome Software)

Protein Sequence Database: Human

UniProtKB/Swiss-Prot database

Spectral Library: HumanmyPrositLib.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. シスプラチン処理用量の設定

シスプラチンは一般に細胞毒性が強いことが知られており、まず基礎的データとして TK6 細胞に対する細胞毒性およびチミジンキナーゼ遺伝子突然変異体頻度に関するデータを取得した。その結果、1.5 $\mu\text{g/mL}$ シスプラチンの用量群で TK6 試験の最適用量 ($\text{RS}=10\sim 20\%$) を得ることができた (Figure 1)。また、その変異体頻度は 30×10^{-6} であり、未処理群の変異体頻度 3.5×10^{-6} と比べ、明らかな上昇を示した。シスプラチン処理用量 0.17、0.5、1.5 $\mu\text{g/mL}$ のすべての処理群で統計的に有意差が認められた (陽性判定)。このうち、0.5、1.5 $\mu\text{g/mL}$ 用量では、処理してから 24 時間後の培養細胞数が 2.6、1.5 倍に回復できる用量であることから、本用量をプロテオミクスの処理実験に利用した。また本研究では、シスプラチン処理の用量依存性を調査することも目的としているため、これら 2 用量についてプロテオミクスすることにした。

2. シスプラチン処理した TK6 細胞プロテオミクス

0.5 および 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 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 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 SSPs を抽出し、Metascape ウェブサイトでエンリッチメント解析を実施した。Table 1 に示した通り、各処理時間 0.5 および 4 hr の処理群において同定できたタンパク質数は、いずれも 5500 を超えた。そのうち、Scaffold DIA の t-test で有意差が得られた SSPs をそれぞれ抽出した (Table 1)。

それら SSPs について、それぞれを単独でエ

ンリッチメント解析した結果、0.5 および 1.5 $\mu\text{g/mL}$ シスプラチン処理群 (0.5 および 4 hr)、並びに未処理群 (0.5 および 4 hr) のすべてで DNA 修復や DNA 損傷応答関連の GO を残念ながら観察することができなかった。

一方、単独ではなく、未処理群と処理群の複数についてエンリッチメント解析する方法を用いた結果、いくつか DNA 修復関連の GO が観察できた (Figure 2、3)。Figure 2 および 3 のヒートマップ上に記載した○はシスプラチン処理により増加した DNA 修復関連 GO であり、×はそうでない。0.5 および 1.5 $\mu\text{g/mL}$ シスプラチン処理群のそれぞれにおいて、0.5 hr と 4 hr を総合的に観察すると、長時間処理すると DNA 修復関連 GO が増える傾向があるかもしれない。一方、0.5 $\mu\text{g/mL}$ と 1.5 $\mu\text{g/mL}$ を比較すると、高用量だからといって DNA 修復関連 GO が多くなることは無かった (Figure 2、3)。これらのことから、本実験条件では用量依存的にサンプリングするよりも、経時的にサンプリングするほうが DNA 修復関連 GO を検出できる傾向が見いだされた。

しかしながら、Figure 2、3 で観察された複数エンリッチメント解析によるヒートマップは Top 100 を示した図であり、かろうじて DNA 修復関連 GO を検出、観察ができたのではないかと考えている。さらに、0.5 および 1.5 $\mu\text{g/mL}$ シスプラチンは、Figure 1 で示したとおり、TK6 試験では明らかな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の実験系でも DNA 修復関連 GO が容易に観察されると予想していたが、そうではなかった。

本研究班の初年度に報告した過酸化水素を処理した実験において、シスプラチン処理とほぼ同条件 (処理してから 24 時間後の培養細胞数が約 2 倍に回復できる用量) でプロテオミクスとエンリッチメント解析をした。その結果は、過酸化水素を処理して 0.5 hr 後サンプリングし

た時に DNA 修復関連 GO が容易に検出され、非常に良好な結果が得られたが、シスプラチン処理 (0.5 hr) はそうでなかった。このことから、おそらく被験物質ごとに DNA 修復関連 GO が観察できる時間帯が大きく異なり、シスプラチンの場合は 1~3 時間後のサンプリングが良かったかもしれない。

以上のことから、まだ実験データが不十分であるが、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、プロテオミクスおよびエンリッチメント解析の実験系は、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 GO 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。本研究によって、遺伝毒性スクリーンが既知であるシスプラチンであっても、DNA 修復関連 GO が観察できるサンプリング時間を見つけることは容易ではなかったため、未知の被験物質の場合ではさらに困難となるかもしれない。プロテオミクスとエンリッチメント解析系において、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。

D. 結 論

最近利用可能になってきた DIA 法によるプロテオミクス技術を遺伝毒性試験に初導入し、シスプラチン処理した TK6 細胞をリシスしたタンパク質溶液から、一度の解析で 5000 以上のタンパク質を同定し、未処理群と比較して統計的有意差のあったタンパク質群についてエンリッチメント解析を行った。複数エンリッチメント解析の結果、明確ではないが、DNA 修復関連 GO を検出できたと考えられた。本実験条件では用量依存的にサンプリングするよりも、経時的にサンプリングするほうが DNA 修復関連 GO を検出できる傾向があった。しかしなが

ら、0.5 および 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 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。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 古西乃々香、北村蒼史、鵜飼明子、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)

F. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1. シスプラチン処理されたTK6細胞のDIA法によるタンパク質同定数

		0.5時間	4時間
実験①	0.5 µg/mLシスプラチン処理群	6942	6626
	処理群SSPs	768	1225
	未処理群	6942	6626
	未処理群SSPs	933	736
実験②	1.5 µg/mLシスプラチン処理群	5602	5778
	処理群SSPs	720	669
	未処理群	5602	5778
	未処理群SSPs	1031	623

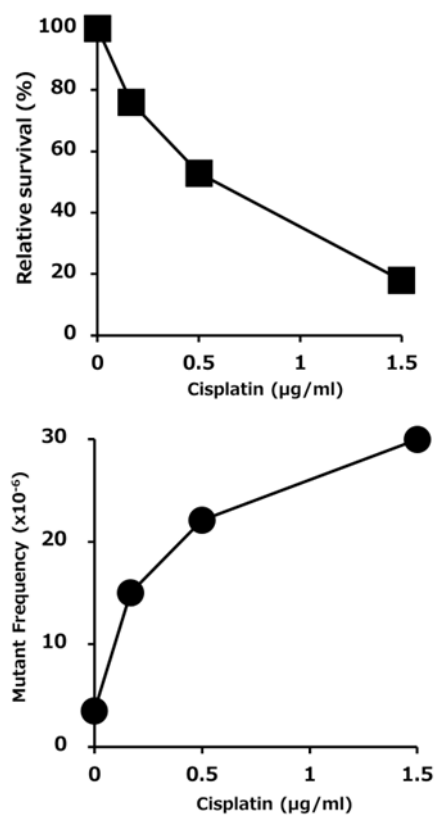


Fig. 1. シスプラチンに対するTK6試験の結果



Fig. 2. シスプラチン(0.5 $\mu\text{g/mL}$)の処理群および未処理群の複数エンリッチメント解析結果 (Top 100)

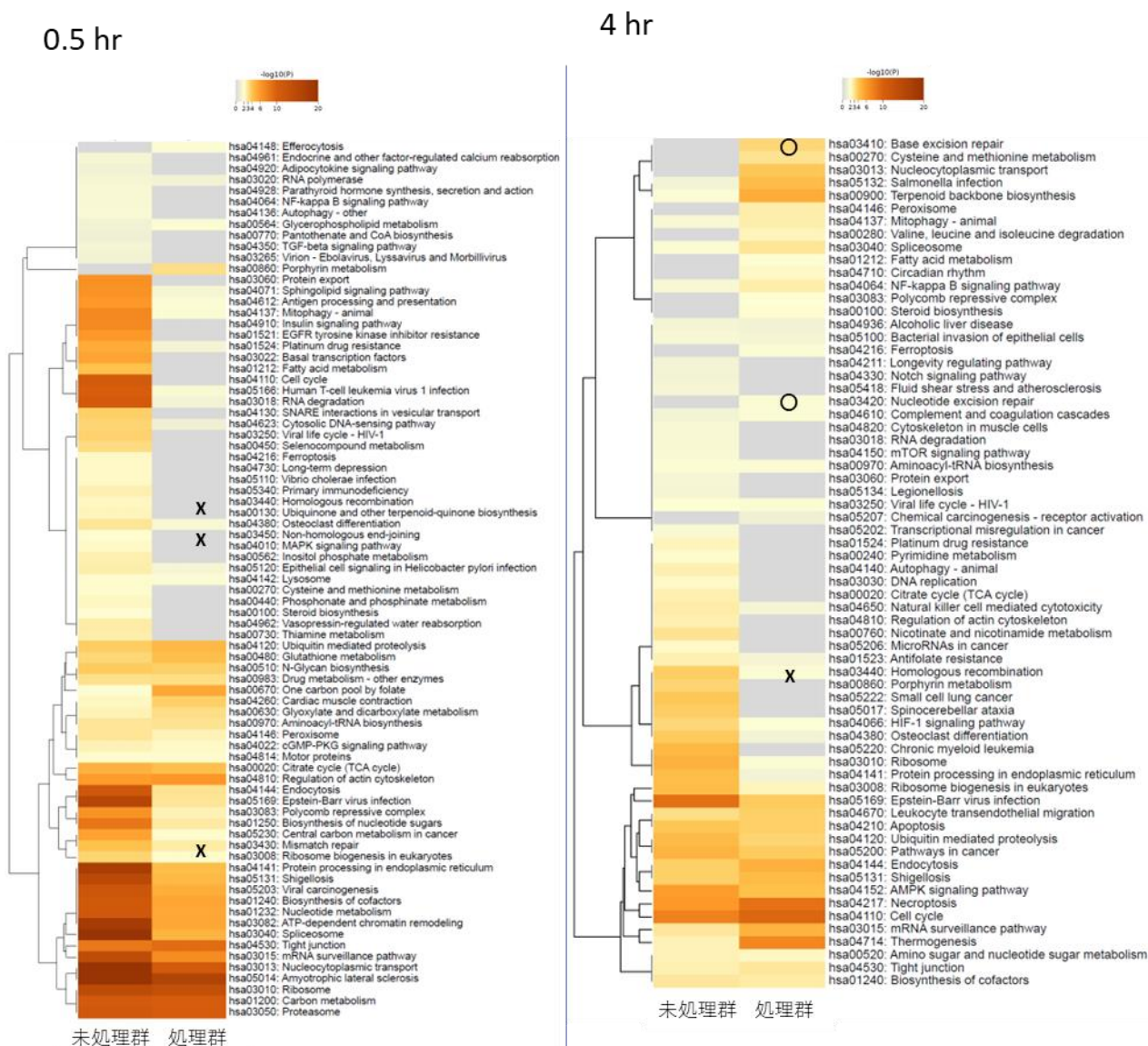


Fig. 3. シスプラチン(1.5 $\mu\text{g/mL}$)の処理群および未処理群の複数エンリッチメント解析結果 (Top 100)

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）
 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 ゲノム安全科学部

研究分担者 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た。その結果、これまでに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、培養細胞では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ている。そのため、上記ChIP法のホルマリン固定化組織標本への適用を試みた。ChIP法ではクロマチン画分の可溶化が必須のため、固定組織標本可溶化の条件検討を実施した結果、「ホルマリン固定下の肝小核試験法」を参照した組織可溶化条件では、過剰なDNA障害が生じてしまい、ChIP法への適用は不適であると判断された。つぎに、「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、引き続き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*-ethyl *N*-nitrosourea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。

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上のタンパク質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法等により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昨年度の分担報告書等で示されている。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、短時間) 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

これまでの研究により、化学物質、特にアルキル化剤によるDNA損傷応答反応について、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、培養細胞では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ている。そのため、この手法の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、パイロット試験として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、*N*-ethyl *N*-nitrosorene (ENU) (100、50 または 25 mg/kg 体重 / 回)、Ethylmethanesulfonate (EMS) (200、100または 50 mg/kg 体重 / 回) または 2-Acetylaminofluorene (2-AAF) (200、100または50 mg/kg体重/回) を24時間ごとに2回腹腔内投与し、最終投与後24時間後に肝臓を採取し、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 (図2)。これらの組織標本の一部を使用し、「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。この方法では12 MのKOH終夜処理を実施して組織標本を可溶化後、超音波処理システムを用いてChIPに最適なDNA画分である500~100 bpのDNA画分が得られ、かつ、高分子DNAが消化されるようなリンカーDNA切断条件を見出すことを目指した。結果として過剰なDNA障害が生じてしまい、ChIP法への適用は不適であると判断し、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。この方法は、培養細胞を用いる一般的なChIP法での可溶化緩衝液量を順次拡大添加

し、加えて可溶化の条件を65°C終夜としてホルマリン固定を脱架橋させ、可溶化を進める。可溶化確認後、超音波処理システムを用いてChIPに最適なDNA画分である500～100 bpのDNA画分が得られ、かつ、高分子DNAが消化されるようなリンカーDNA切断条件を見出すことを目指した。その結果、ChIP法への適用可能性が見出されたため、引き続き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）およびハウスキープ遺伝子である*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。得られたDNA定量結果は統計ソフトであるエクセル統計を用いて、PBS_101群（図2）に対するDunnettの多重比較検定（増加傾向）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

「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。12 MのKOH終夜処理を実施して組織標本を可溶化後、超音波処理システムを用いて30～300サ

イクルまで超音波処理を実施し、アガロースゲル電気泳動法によりDNAの状態を確認したが、ChIPに最適とされる500～100 bpのDNA画分が得られなかった。また、低サイクル数時にも高分子DNAが見られなかった（図3）。

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。超音波処理システムを用いて30～60サイクルまで超音波処理を実施し、アガロースゲル電気泳動法によりDNAの状態を確認した。その結果、30サイクルでは高分子DNAが検出され、超音波サイクル数の増加に応じてDNAの切断が見られた。これらのDNA画分はChIPに最適とされる500～100 bpの範囲内であった（図4）。

ChIPに最適とされるDNA切断条件が得られたため、この条件下でPBSまたは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_2およびrDNA_4のプライマーセットを用いたDNA定量では、PBS_101群と比較してENU_101群およびENU_102群では有意に多くの沈降DNA量が検出された（図5AおよびB、* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ ）。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_101群と比較して有意な差を示した群は見られなかった（図5C）。

また、組織の可溶化条件の検討に大幅な時間を要したため、他の投与群の解析は未了となってしまったが、作成した組織標本は次期新規研究課題で利用予定である。

D. 考察

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、「ホルマリン固定下の肝小核試験法」の可溶化条件はChIP法に不適であ

る一方で、「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ENU投与によるAPE1のrDNAへの結合量の増大が見られた。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。

E. 結論

ChIP法ではクロマチン画分の可溶化が必須のため、固定組織標本可溶化の条件検討を実施した結果、「ホルマリン固定下の肝小核試験法」を参照した組織可溶化条件では、過剰なDNA障害が生じてしまい、ChIP法への適用は不適であると判断された。つぎに、「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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. 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, Pfuhler 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. 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)
2. 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 : In vivo mutagenicity evaluation of cobalt acetate tetrahydrate. 第51回日本毒性学会学術年会 (2024.7)
3. 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)
4. 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)

別添 4

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. 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)
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)

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

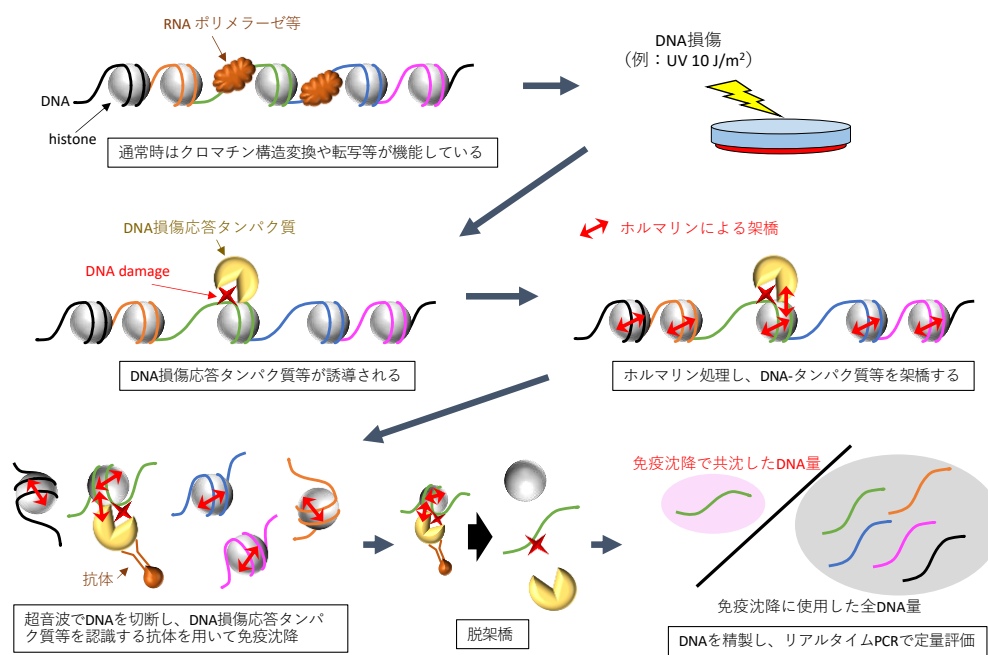


図1. ChIP assayを利用したDNA損傷応答の検出

	Chemical	Animal ID	Dose	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3 採材
C57BL/6NCrSlc 3 animals/group	PBS	PBS_101~103		血液	IP	IP	血液 肝臓
	ENU	ENU_101~103	100 mg/kg				
		ENU_201~203	50 mg/kg				
		ENU_301~303	25 mg/kg				
	EMS	EMS_101~103	200 mg/kg				
		EMS_201~203	100 mg/kg				
		EMS_301~303	50 mg/kg				
	2-AAF	2-AAF_101~103	200 mg/kg				
		2-AAF_201~203	100 mg/kg				
		2-AAF_301~303	50 mg/kg				

図2. 組織標本作成のための投与プロトコル

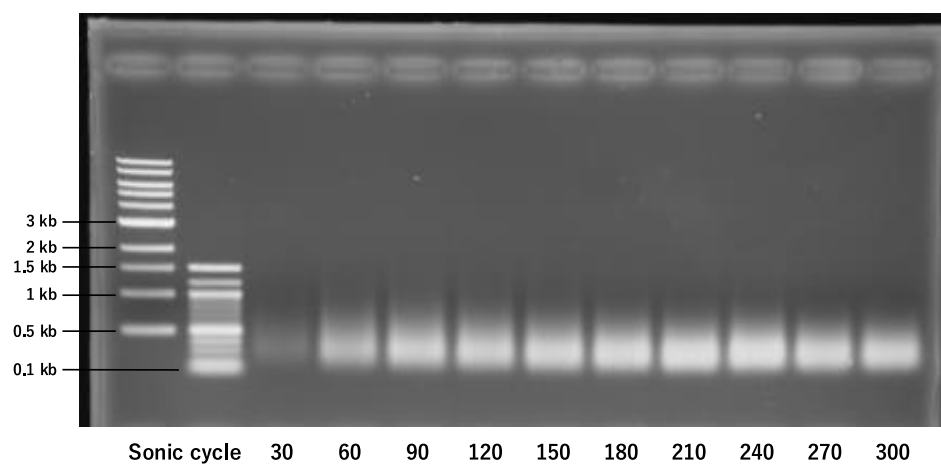


図3. 「ホルマリン固定下の肝小核試験法」を参照した組織可溶化およびDNA切断

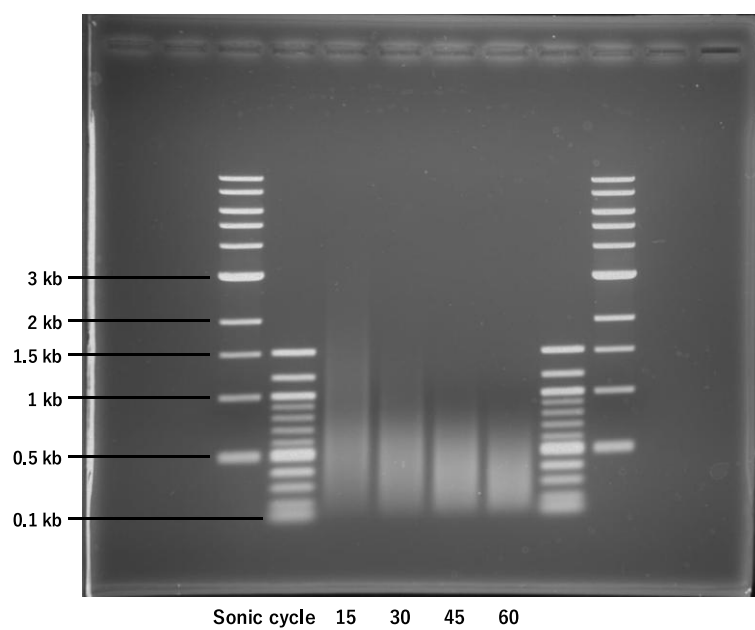


図4. 拡大希釈および終夜脱架橋による固定組織の可溶化とDNA切断

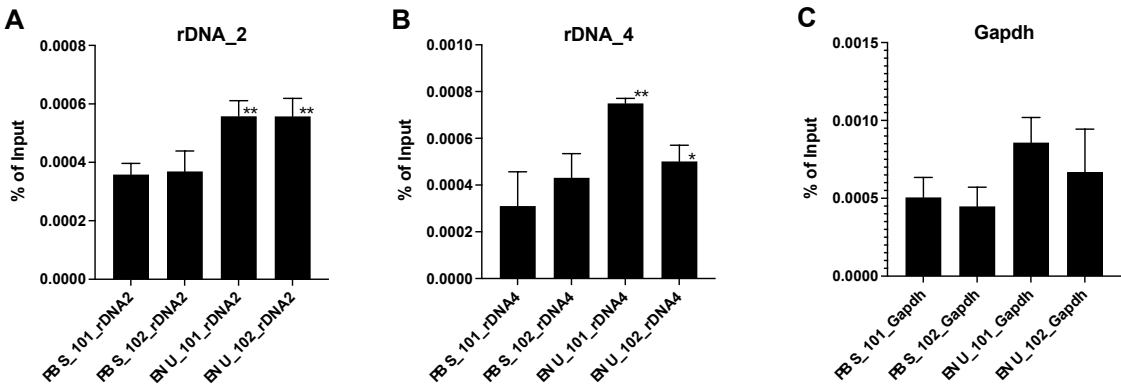


図5. 抗APE1抗体を用いたクロマチン免疫沈降法によるDNA損傷応答

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）
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 ゲノム安全科学部
研究分担者 伊澤和輝 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部
研究分担者 鈴木孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部
研究分担者 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。前年度までに、過去のラットを用いたTGR試験サンプルからecNGSによるDNA配列情報の取得を試みた。結果として、ラット試料を用いた場合もecNGSによる変異原性評価が可能であることが示されていたが、一用量サンプルのみの結果となっていた。本年度においては、変異原性評価に重要な用量反応性について検討を行うべく、過去のTGR試験サンプルにおいて用量反応性が示されているラット試料を用いて、ecNGS解析を行った。サンプルについては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。非投与群、中用量群、高用量群のサンプルについて解析した結果、ecNGSから得られたデータは用量反応性を示し、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ecNGSによる変異原性評価手法が既存手法の代替法として有用であることを示す。

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、前年度までにNGSを基盤とする低頻度体細胞変異検出手法であるecNGS手法に着目している。また一般毒性試験や発がん試験で広く用いられるラットのサンプルに対しecNGS手法を利用した例が少なかったため、ラットのサンプルを用い基盤情報の収集を行った。結果として、ラットのサンプルにおいてもecNGS手法による変異原性評価が可能であることが示されたが、一用量のみのデータであり、用量反応性の検出について課題が残った。そのため、本年度においては、過去のラットを用いたTGR試験において用量反応性が認められたサンプルを用いecNGS手法を利用し、用量反応性が検出可能であるかについて検討した。

B. 研究方法

過去の TGR 試験 (Ishii et al., 2023) において得られていた溶媒(Corn oil)投与群 1 個体、薬剤中用量投与群 2 個体、薬剤高用量投与群 2 個体のラット (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、エレミンを 100 mg/kg body weight/day (中用量)、400 mg/kg body weight/day (高用量) の用量で 13 週間投与されている。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) におけるライブラリ作製プロトコルを改良し、ゲノム DNA を NEBNext® dsDNA Fragmentase® (New England Biolabs, USA) により、37°C、30 分の条件で断片化を行った。断片化した

DNA を Invitrogen™ S1 Nuclease (Thermo Fisher Scientific, USA) で 30°C、30 分処理した。得られた約 150bp 程度の 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 NovaSeq (Illumina, Inc., CA, USA) を用いた NGS シーケンスサービス (Azenta US Inc., USA) を利用した。

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、公開されているラットのゲノム配列 (GRCr8) 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、全てのリードから検出された 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。

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、溶媒投与群において 1.11×10^{-7} 、エレミシン中用量投与群において平均 1.90×10^{-7} 、エレミシン高用量投与群において平均 7.35×10^{-7} の頻度で変異が見られた。この結果から、PECC-Seq 法はエレミシン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る。また中用量、高用量群について用量依存的な変異頻度の上昇がみられたことから、用量反応性についても検出可能であると考えられた。加えて、*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・変異頻度は高い相関 ($R^2=0.93$) を示した。これらの結果は ecNGS 手法が既存の TGR 試験と同等の変異検出力を持ち、TGR 試験を代替可能であることを示す。

C-2. ecNGS 手法から得られる変異スペクトル

PECC-Seq 法において得られた変異スペクトルを図 2 に示す。中用量、高用量のサンプルについては平均変異頻度を示した。先行研究 (Ishii et al., 2023) の TGR 試験において T>A、T>C の変異が大幅に増加していることが示されていたが、ecNGS 解析から得られた変異スペクトルにおいても、T>A、T>C の変異が増加していることが示された。加えて、これらの変異は用量依存的に増加していることが示された。

これらの結果から、PECC-Seq 法はラットサンプルにおいてもエレミシン特有の変異を用量依存的に検出することが可能であることを示す。

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。

これまで 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り、さらに変異原性評価において重要である用量反応性についても検出可能であることが示された。

ecNGS 手法は原理的にゲノム全体から変異頻度を評価可能であるため、TGR を用いない *in vivo* 毒性試験である発がん性試験や一般毒性試験の試験試料に対し、ecNGS 手法を用いることによって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および代替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。これらの流れの中で、発がん性試験や一般毒性試験において頻用されるラット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と言える。

またこれまでのがん原性評価においてはラットが用いられることが多かった一方で、*in vivo* 変異原性評価においてはマウスが用いられることが多かった。変異原性試験とがん原性試験の結果についてはデータの定量性のほか種差というギャップが存在している状況であると言える。

一方で、本研究によりラットに対し ecNGS 手法が適用可能であることが示されたため、今後既存のがん原性試験に用いられたラット由来のサンプルからのデータ収集を継続することにより、将来的に変異頻度と発がん頻度が比較可能となる可能性がある。今後の発がん性定量評価を見据えた ecNGS による変異頻度データ拡充に関して、冷凍保存されたサンプルのみならず、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプル等の長期間保存されたサンプルから ecNGS 手法による変異頻度解析が可能であるのかの検討が今後必要であると考えられ

る。

E. 研究発表

E-1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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

7. Nakano T, Akamatsu K, Kohzaki M, Tsuda M., Hirayama R, Sassa A, Yasui M., Shoulkamy 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.* 7;53(1). 2025

E-2. 学会発表

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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
8. 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胞胚転移時における 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)
 9. 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)
 10. 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)
 11. 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)
 12. 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)
 13. 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)
 14. 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)
 15. 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)
 16. 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)
 17. 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)
 18. 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)
 19. 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)
 20. 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)
 21. 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)
 22. 鈴木孝昌 “Error-corrected next-generation sequencing (NGS)” as an ultimate tool for genetic toxicology 第47回インド環境変異原学会年会 2025年1月31日 (アンナマライ/インド)
- 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

表 1. NGS 解析結果の概略

サンプル名	用量 (mg/kg bw/day)	解析塩基数	変異数	変異頻度 ($\times 10^{-7}$)	gptアッセイにおける 変異体頻度* ($\times 10^{-5}$) (Ishii et al.)
EL105	0	288,699,909	32	1.11	0.37
EL304	100	97,487,720	23	2.36	0.62
EL305	100	83,827,032	12	1.43	1.55
EL403	400	102,949,173	79	7.67	5.45
EL405	400	74,006,277	52	7.03	4.58

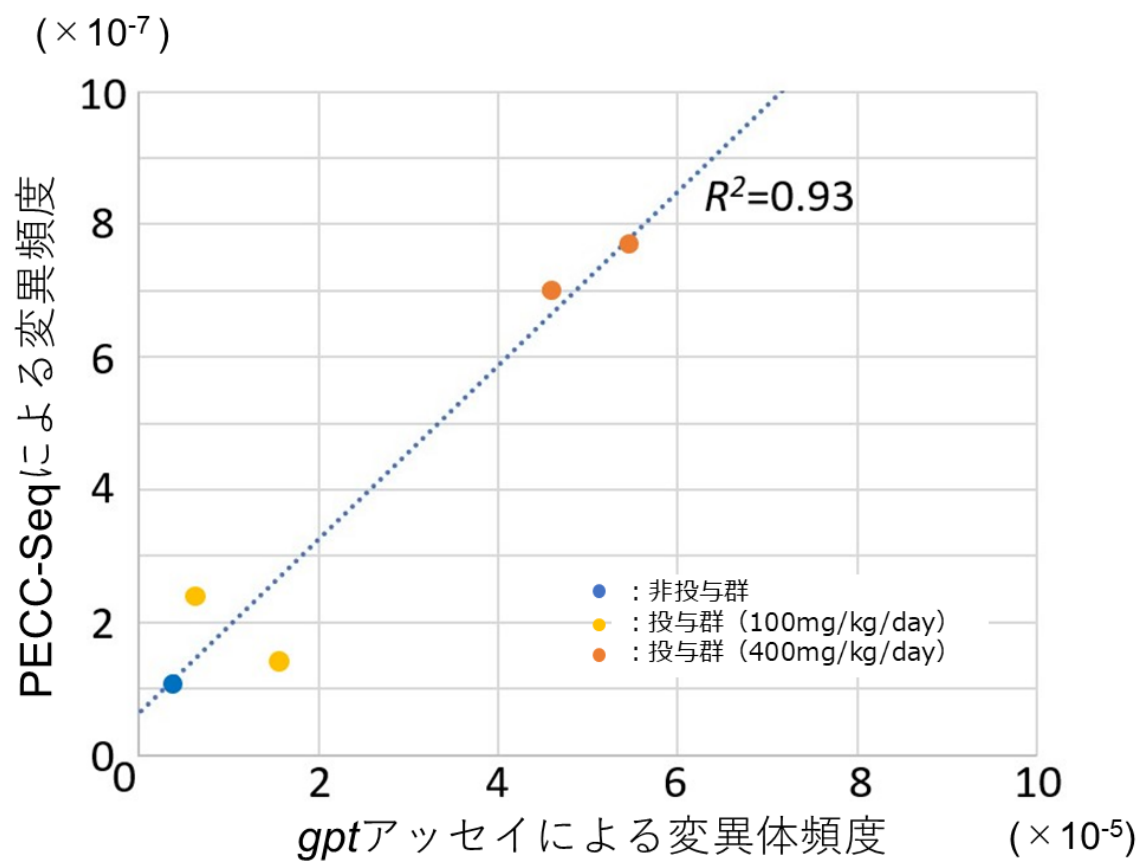


図 1. 既存手法による変異体頻度と NGS 手法による変異頻度比較

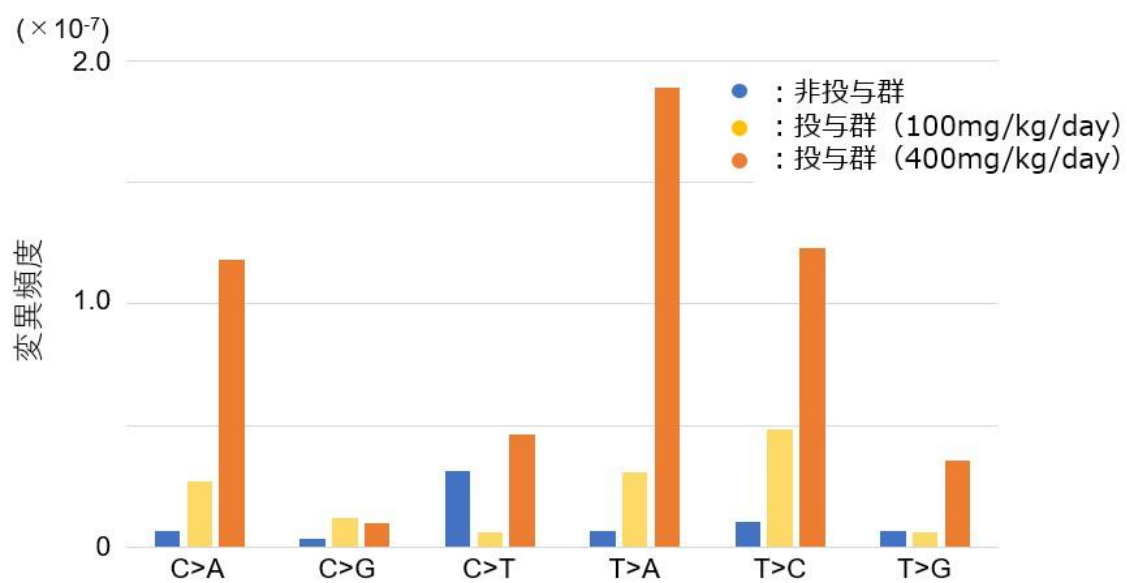


図 2. エレミシン投与群における各スペクトラムの変異頻度

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）
 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肝細胞（micronucleated hepatocyte; MNHEP）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5年度に構築した γ -H2AXの免疫組織化学染色によるHLMN assayの有用性を検討した。種々の被検物質をラットに28日間投与し、肝臓小核試験及びHLMN assayを実施した結果、MNHEPの発生頻度の変化はいずれのassayにおいても肝発がん物質で増加し、非肝発がん物質において変化しなかった。以上から、HLMN assayがMNHEPの検出に有効であることが示唆された。染色体不安定性による化学発がん機序として、acetamide (AA) 誘発肝腫瘍についてオプティカルゲノムマッピングによる構造異形解析と蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション解析を行った結果、Mycを含むコピー数増加領域が複数の染色体への転座を経て染色体外環状DNA (ecDNA) を形成していることが明らかになった。染色体粉砕と再構成によって生じるecDNAの存在は、AAの肝発がんにおけるchromothripsisの関与を支持する結果であった。さらに、本年度は新規試験法評価として、遺伝毒性肝発がん物質であるquinolineを*gpt delta*ラットに28日間反復投与し、肝臓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。

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¹⁾。Chromothripsis は、小核の核膜の崩壊と染色体の粉砕の後、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、再構成される現象である。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。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^{2,3)}。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知られており⁴⁾、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、病理組織学的に小核を有する細胞を検出することで、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法では 28 日間投与が高感度であることから⁴⁾、小核を有する細胞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。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。

令和 4 年度は、小核を誘発する肝発がん物質 acetamide (AA)、N-nitrosopropylamine 及び quinoline を投与したラット肝臓の網羅的遺伝子発現解析を実施し、令和 5 年度は遺伝子がコードするタンパクから、小核を有する細胞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 γ -H2AX 抗体を用いた IHC による小核を有する細胞の検出を検討し、病理組織学的肝臓小核試験 (HLMN assay) の可能性を示した。令和 6 年度は HLMN assay の有用性を確認するため、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 (KBrO₃) を用い、本法と肝臓小核試験の比較を行った。

また、本研究では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^{5,6)}で誘発した肝腫瘍における染色体粉砕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、acetamide (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 タンパクの発現を明らかにした。令和 5 年度は IHC により腫瘍における MDM2 タンパクの発現を明らかにした。令和 6 年度は AA 誘発のラット肝腫瘍についてオプティカルゲノムマッピング解析による染色体構造異形の解析を実施し、これまでに明らかになったがん遺伝子のコピー数増加と構造異形の関係を検索した。

さらに、令和 6 年度は、新規試験法評価として、遺伝毒性肝発がん物質である 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、その結果と凍結サンプルを班員に提供する。

B. 研究方法

B-1. 材料および試薬

NPYR (>95%) は Toronto Research Chemicals 社(カナダ)から, MP HCl(>99%) は Sigma-Aldrich 社(米国)から, quinoline (>97%) 及び TAA (>98%) は東京化成工業(東京)から, KBrO₃ (>99%) は Thermo Fisher Scientific 社(米国)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

雄性 5 週令の F344 ラット 25 匹を日本エスエルシー株式会社より購入し, CRF-1 粉末基礎飼料(オリエンタル酵母工業株式会社, 東京)と調整水で飼育した。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 ± 1°C, 湿度 55 ± 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 2 又は 3 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, 飼料及び調整水は試験期間中, 自由に摂取させた。一週間の馴化期間の後, ラット 25 匹を各群 5 匹に配し, 対照群と NPYR, KBrO₃, MP 及び TAA 投与群を設けた。NPYR, KBrO₃, MP 及び TAA 注射用水に溶解し, それぞれ 50, 80, 80 及び 20 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注射用蒸留水を投与した。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, 外側左葉, 中葉及び尾状葉の一部を 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 γ -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, 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。

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。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。

抗 γ -H2AX 抗体を用いた HLMN assay では, 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肝組織標本から作製した組織切片を, キシレン及び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 γ -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。

MNHEP 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, 中葉でカウントを行った。また, 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)を用いて, カウントした葉から 0.16 mm²の正方形領域をランダムに 6 枚取得し, これら領域の核密度から MNHEP をカウント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。統計学的解析では, Kruskal-Wallis 検定により群間の差異を検出した後, Steel 検定による多重比較検定を行った。

B-3. 染色体不安定性による化学発がん機

序の解明

オプティカルゲノムマッピング解析は、AA を 2.5% の濃度で 26~30 週間混餌投与した F344 ラットの肝臓から採取した凍結腫瘍組織（肝細胞腺腫 1 例及び肝細胞癌 2 例）と、diethylnitrosamine (DEN) 及び phenobarbital で誘発したラット肝細胞癌 2 例、正常肝組織 1 例を解析に用いた。約 10 mg の凍結組織から SP Tissue and Tumor DNA Isolation Kit (BioNano、米国) を用いて長鎖 DNA を抽出した。抽出した長鎖 DNA の濃度を測定し、750 ng の DNA を DLS-G2 Labeling kit (BioNano) を用いて蛍光標識し、Saphyr System (BioNano) で電気泳動することで、直鎖化した DNA の蛍光標識パターンの画像を取得した。Bionano Access Software (BioNano) を用いて蛍光標識パターンからゲノムアセンブリを行い、ラットのリファレンス配列 (GRCr8) にアライメントした後、対象群で認められた染色体構造異形を差し引くことで、投与群特異的な染色体構造異形を抽出した。蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) では、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組織標本から作製した、6 µm の組織切片を用いた。キシレン及び無水エタノールにて脱パラフィンした後、Target Retrieval Solution pH9.0 (Dako、デンマーク) を用いたオートクレーブ処理により不活化した。0.01% ペプシン/0.1N 塩酸溶液にて処理し、PBS で洗浄後、エタノールにより脱水及び乾燥を行った。Rat Myc/7cen FISH probe (Chromosome Science Labo、北海道) を滴下し、90°C のホットプレートで変性処理した後、37°C で一晚インキュベートした。SSC 溶液で洗浄後、VECTASHIELD 社製 mounting medium with DAPI で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

B-4. 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

5 週齢の雄性 F344 系 *gpt* delta ラット 20 匹を日本エスエルシー株式会社 (静岡) から

購入し、透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収容した。飼育条件は B-2-1 に同じ。ラットは各群 5 匹に配し、対照群と低用量、中間用量及び高用量群の計 4 群を設けた。文献情報及びこれまでの試験結果をもとに、高用量を発がん用量の 80 mg/kg 体重/日、中間用量および低用量群は公比 4 で除した 20 および 5 mg/kg 体重/日とし、13 週間強制経口投与した。対照群には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、体重及び摂餌量測定は週 1 回実施した。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、外側左葉、内側右葉、内側左葉及び尾状葉の一部を 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を施して、病理組織学的検索に供した。また、肝臓の外側左葉の一部は、*in vivo* 変異原性試験 (*gpt* assay 及び *Spi* assay) 及び ecNGS による変異原性試験の評価に供するため液体窒素により急速凍結して -80°C で保存した。

gpt assay では回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また、ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 遺伝子変異体頻度 (MF) を算出した。また、6-TG と Cm に耐性となったコロニーはサンガーシーケンス (Azenta、東京) にて *gpt* 遺伝子の塩基配列解析を行い、変異部位を同定した。

(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。また、遺伝子組換え動物の使用については、「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

C-1. γ -H2AX の免疫組織化学染色による HLMN assay の有用性評価

被検物質を 28 日間反復投与したラット肝臓の最終体重及び肝重量を Table 1 に示す。KBrO3 群では誤投与により 1 例の死亡が認められた。NPYP, TAA 及び MP 群では、投与開始 1 週目から体重増加抑制が認められ、最終体重において有意な低値を示した。また、TAA 群では肝実重量及び相対重量の、MP 群では相対重量の有意な増加が見られた。病理組織学的検索の結果を Figure 1 および Table 2 に示す。NPYP 及び MP 群では、肝細胞の壊死、カリオメガリー及びオーバルセルの過形成が、TAA 群ではカリオメガリーが見られた。

肝臓小核試験および HLMN assay の結果を Figure 2 に示す。HLMN assay では抗 γ -H2AX 抗体に陽性を呈する小核を持つ肝細胞 (Fig. 2C) をカウントした。肝臓小核試験では、対照群に比して NPYP 及び MP 群で有意な増加が、TAA 群で増加傾向が見られ、KBrO3 群で変化は見られなかった。HLMN assay では、NPYP, TAA 及び MP 群で対照群に比して有意な増加を示し、

KBrO3 群で変化は見られなかった。なお、HLMN assay で得られた MNHEP の頻度は、肝臓小核試験の約 1/10 であった。

C-2. 染色体不安定性による化学発がん機序の解明

オブティカルゲノムマッピング解析で得られた染色体内および染色体間転座の結果を Figure 3 に示す。AA 誘発肝腫瘍では、すべてのサンプルで高頻度な転座が認められたのに対し、DEN 誘発肝腫瘍ではそれらの変化はほとんど見られなかった。また、7 番染色体の Myc を含むコピー数増加領域の前後では染色体間転座が見られ (Fig. 3C)、転座先を検索した結果、これらの領域はいずれも環状 DNA を形成していることが明らかになった (Fig. 4)。さらに、Myc と 7 番染色体セントロメア (CEN7) の FISH 解析を行った結果、非腫瘍部の肝細胞では、CEN7 と Myc は対になって検出されたのに対し、腫瘍細胞では CEN7 の増加を伴わない、Myc の増幅が確認された (Fig. 5)。

C-3. 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

肝臓の *gpt* assay の結果を Table 3 に示す。Quinoline 投与群では、用量依存的な MF の上昇が認められ、中間用量群から有意な変化となった。*gpt* 変異体の変異スペクトラム解析の結果、中間用量群から G:C-C:G transversion の有意な増加が、高用量群では G:C-T:A 及び A:T-T:A transversion, A:T-G:C transition の有意な増加が認められた (Table 4)。

D. 考察

D-1. γ -H2AX の免疫組織化学染色による HLMN assay の有用性評価

遺伝毒性肝発がん物質である NPYP, 非遺伝毒性肝発がん物質である TAA 及び MP, 遺伝毒性非発がん物質である KBrO3 を投与したラット肝臓において、肝臓小核試験及び HLMN assay による MNHEPs の検

出を行った。その結果、いずれの検出法においても NPYP, TAA 及び MP 群において MNHEP の増加が認められ、対照群に対する増加の割合も同程度であった。一方、KBrO₃ 群ではいずれの検出法においても変化は見られなかった。従って、HLMN assay には肝臓小核試験と同程度の検出力があると考えられた。また、令和 5 年度の検討結果と同様に、HLMN assay における MNHEP の頻度は肝臓小核試験の 1/10 程度の値を示したが、これは細胞の断面を評価していることに起因する差と考えられる。一方、一切片あたり 100 万個以上の肝細胞を観察する HLMN assay では、対照群でも常に数個の MNHEP が検出されることから、被検物質投与による変化を正確に評価できると考えられた。また、既報⁴⁾と同様に MNHEP の増加は、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認められた。このことは、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。

D-2. 染色体不安定性による化学発がん機序の解明

染色体の構造異形を検出するオプティカルゲノムマッピング解析の結果から、Myc 遺伝子を含む 7 番染色体のコピー数増加領域が他の染色体に転座し、環状の DNA を形成していることが示唆された。また、FISH 解析では、腫瘍細胞において CEN7 の増加を伴わない Myc 遺伝子の増幅が認められ、Myc を含む染色体外環状 DNA (ecDNA) の形成が明らかになった。セントロメアを持たない ecDNA は、細胞分裂時に不均等に分配され、高度に増幅されることから、AA 誘発腫瘍で認められた Myc 遺伝子の顕著なコピー数増加の原因と考えられた。また、小核によって引き起こされる 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 のラット肝発がん過程において chromothripsis が生じたこ

とを支持するものと考えられた。

D-3. 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

gpt assay の結果、quinoline を投与したラット肝臓では G:C-C:G transversion の増加を特徴とする遺伝子変異が誘発された。これらの変異の特徴は既報と一致するものであった。また、低用量群の *gpt* MF の上昇は約 2 倍で、有意差は認められなかったが、変異スペクトラム解析では G:C-C:G transversion の明らかな増加が確認されたことから、毒性学的意義のある変化と考えられた。

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

γ -H2AX の免疫組織化学染色による HLMN assay の有用性を確認した。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を用いて肝臓の MNHEP の割合を評価できることを確認した。また、本法は肝臓小核試験と同様、肝発がん性評価への応用も期待された。

E-2. 染色体不安定性による化学発がん機序の解明

AA 誘発腫瘍で認められた Myc のコピー数増加が、ecDNA の形成によって生じていることが明らかになった。以上より、AA の肝発がんは chromothripsis による染色粉砕と再構成が寄与すると考えられた。

E-3. 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

Quinine のレポーター遺伝子変異原性試験を実施し、変異体頻度及び変異スペクトラムを明らかにした。また、新規試験法との比較のため、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. 研究成果

G-1. 発表論文

1. 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](https://doi.org/10.1111/cas.16324)

G-2. 学会発表

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 化学発がんにおけるクロモスリプシスの関与, 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)

5. 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)

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. 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.

別添 4

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

	Control	NPYR	TAA	MP	KBrO3
No. of animals	5	5	5	5	4
Body weight	236.5 ± 10.2 ^a	200.0 ± 19.7**	199.9 ± 10.6**	186.2 ± 5.6**	222.7 ± 24.5
Absolut liver weight (g)	7.42 ± 0.41	6.63 ± 0.77	8.76 ± 0.58*	8.08 ± 0.33	7.22 ± 1.06
Relative liver weight (g/100gBW)	3.14 ± 0.07	3.31 ± 0.07	4.38 ± 0.07**	4.34 ± 0.15**	3.23 ± 0.13

^a Mean ± SD

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

Table2. Histopathological findings in rat liver treated with test compounds for 4 weeks.

Findings (±,+,++,+++)	Control	NPYR	TAA	MP	KBrO3
No. of animals	5	5	5	5	4
Liver					
Oval cell hyperplasia	0	5 (5/0/0/0)	0	5 (0/5/0/0)	0
Apoptosis	0	5 (3/2/0/0)	0	5 (2/3/0/0)	0
Karyomegaly, hepatocyte	0	5 (4/1/0/0)	5 (2/3/0/0)	5 (5/0/0/0)	0

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

Table 3. *gpt* mutant frequencies in the livers of F344 *gpt* delta rats administered with quinoline for 4 weeks

Group	Animal no.	No. of packaging	Cm ^R colonies (x10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequencies (x10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg	101	2	6.8	8	1.18	0.83 ± 0.34 ^a
	102	2	8.2	4	0.49	
	103	2	8.4	4	0.48	
	104	2	10.8	10	0.92	
	105	2	9.0	10	1.11	
5 mg/kg	201	2	8.5	13	1.54	1.72 ± 0.69
	202	2	8.9	11	1.24	
	203	2	9.6	12	1.25	
	204	2	9.6	16	1.67	
	205	2	8.9	26	2.92	
20 mg/kg	301	2	7.1	44	6.23	4.58 ± 0.94*
	302	2	11.5	51	4.43	
	303	2	9.7	40	4.13	
	304	2	10.3	40	3.88	
	305	2	8.2	35	4.25	
80 mg/kg	401	2	1.8	26	14.37	14.45 ± 3.65**
	402	2	1.7	29	16.87	
	403	2	2.1	21	9.97	
	404	2	2.2	26	11.99	
	405	2	2.4	46	19.07	

^a: Values are means ± SDs

*, **Significantly different from the 0 mg/kg group at p < 0.05, 0.01, respectively.

Table 4. *gpt* mutation spectra in the livers of F344 *gpt* delta rats administered with quinoline for 4 weeks

	0 mg/kg		5 mg/kg		20 mg/kg		80 mg/kg	
	Number (%)	Mutation frequencies ($\times 10^{-5}$)	Number (%)	Mutation frequencies ($\times 10^{-5}$)	Number (%)	Mutation frequencies ($\times 10^{-5}$)	Number (%)	Mutation frequencies ($\times 10^{-5}$)
Base substitution								
Transversions								
G:C-T:A	16 (44.4)	0.38 ± 0.17^a	18 (23.1)	0.39 ± 0.27	57 (27.1)	1.22 ± 0.17	28 (18.9)	$2.78 \pm 1.16^{**}$
G:C-C:G	3 (8.3)	0.07 ± 0.07	30 (38.5)	0.67 ± 0.53	102 (48.6)	$2.25 \pm 0.79^{**}$	88 (59.5)	$8.59 \pm 1.56^{**}$
A:T-T:A	1 (2.8)	0.02 ± 0.05	2 (2.6)	0.04 ± 0.06	5 (2.4)	0.12 ± 0.10	9 (6.1)	$0.93 \pm 0.80^{**}$
A:T-C:G	0	0	1 (1.3)	0.02 ± 0.05	5 (2.4)	0.10 ± 0.14	3 (2.0)	0.30 ± 0.55
Transitions								
G:C-A:T	14 (38.9)	0.33 ± 0.14	16 (20.5)	0.35 ± 0.26	25 (11.9)	0.55 ± 0.17	10 (6.8)	0.90 ± 0.57
A:T-G:C	0	0.04	1 (1.3)	0.02 ± 0.05	6 (2.9)	0.13 ± 0.04	7 (4.7)	$0.66 \pm 0.74^*$
Deletion								
Single bp	1 (2.8)	0.02 ± 0.04	4 (5.1)	0.09 ± 0.09	4 (1.9)	0.09 ± 0.05	2 (1.4)	0.18 ± 0.24
over 2bp	1 (2.8)	0.02 ± 0.04	4 (5.1)	0.09 ± 0.09	2 (1.0)	0.04 ± 0.05	1 (0.7)	0.12 ± 0.26
Insertion	0	0	1 (1.3)	0.02 ± 0.05	3 (1.4)	$0.07 \pm 0.07^*$	0	0
Complex	0	0	1 (1.3)	0.02 ± 0.05	1 (0.5)	0.02 ± 0.04	0	0

*: Values are means $\pm$ SDs

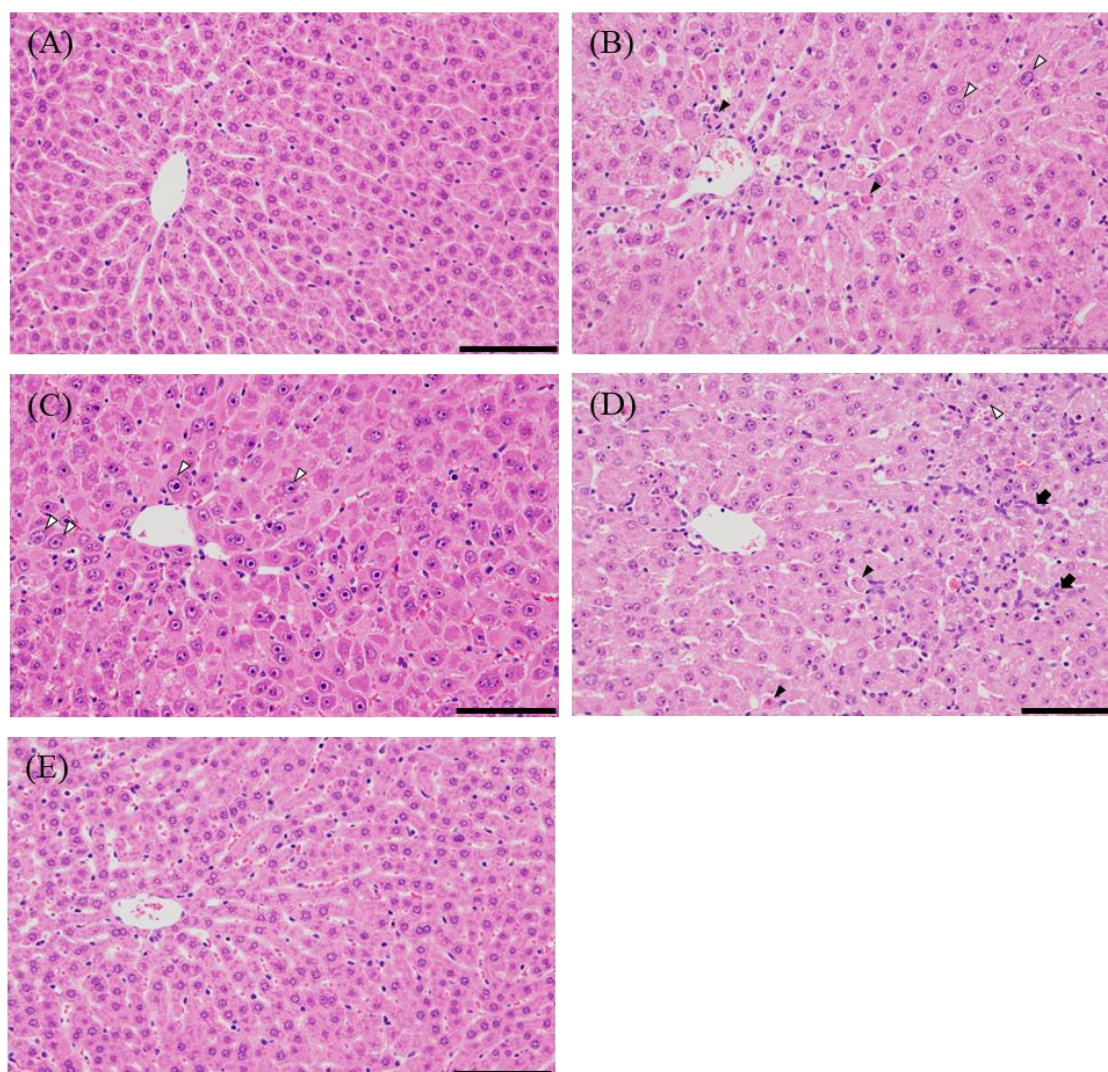


Figure 1. Representative photographs of livers of F344 rats treated with (A) vehicle, (B) NPYP (C) TAA, (D) MP and (E) KBrO₃ for 4 weeks. Single necrosis (arrowhead), Karyomegaly (open arrowhead), and oval cell proliferation (arrow) were observed. Scale bar is 100 μ m.

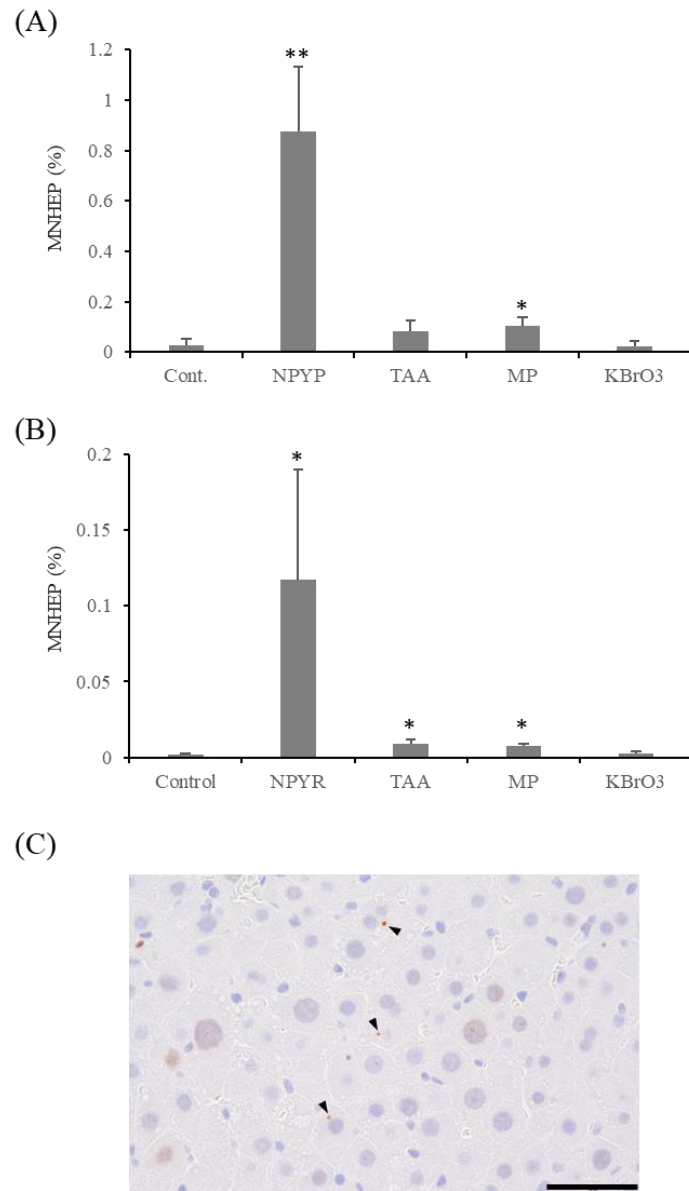


Figure 2. (A) The ratio of MHHEP analyzed by liver micronucleus assay (A) and HLMN assay (B). *, **Significantly different from the control group at $p < 0.05$, 0.01, respectively. (C) Representative photographs of γ -H2AX-positive micronucleated hepatocytes (arrowhead). Scale bar is 50 μ m.

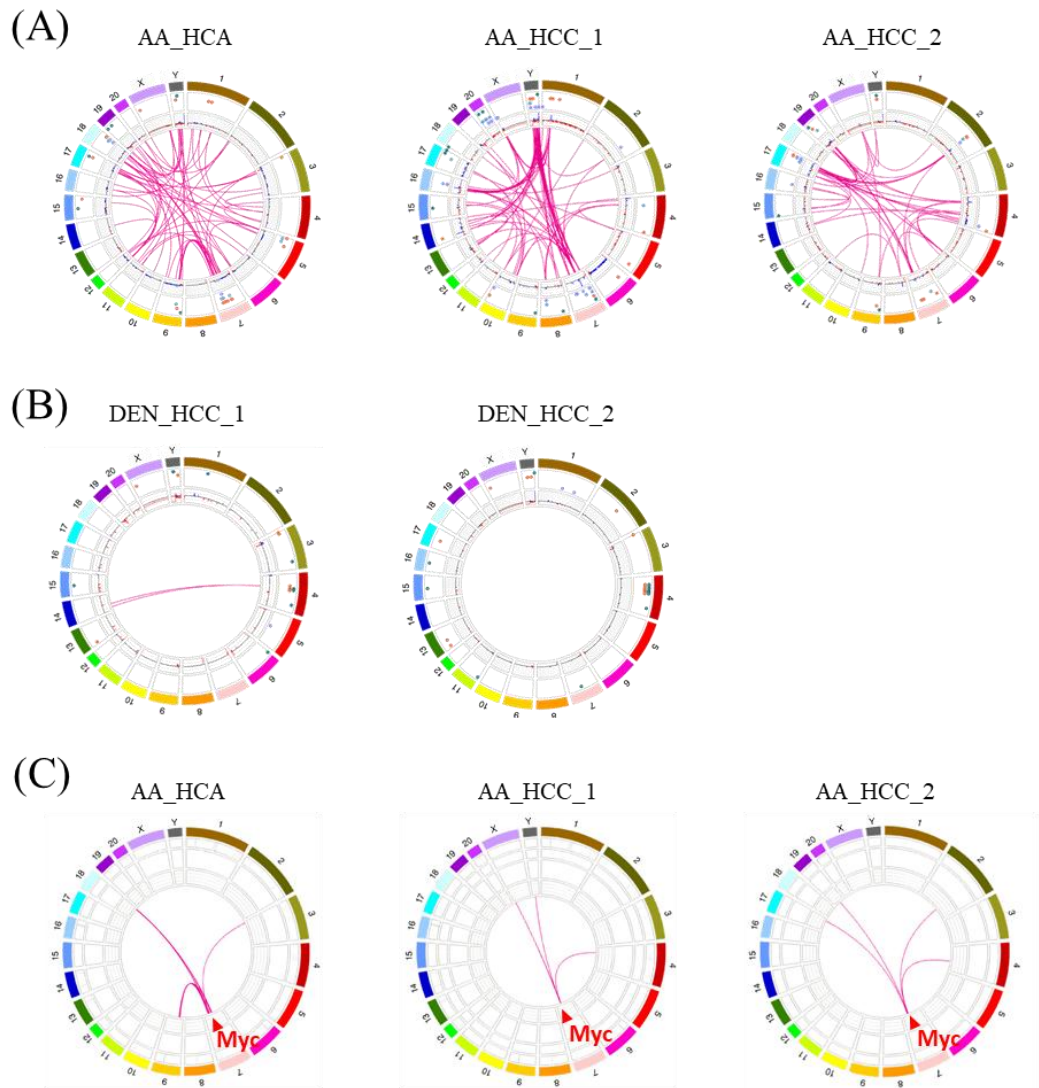


Figure 3. (A) Circos plot visualizing translocations between chromosomes observed in AA-induced liver tumors (A) and DEN-induced liver tumors (B). Chromosomes are radially aligned. Arcs within this circle indicate inter-chromosomal and intra-chromosomal interactions. (C) Myc-related inter-chromosomal interactions.

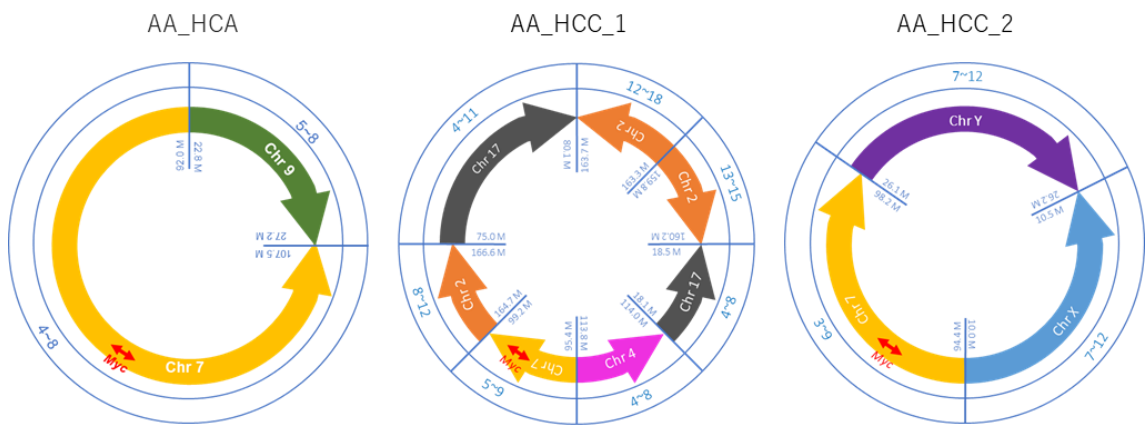


Figure 4. Myc containing extra-chromosome circular DNA detected in AA-induced liver tumors.

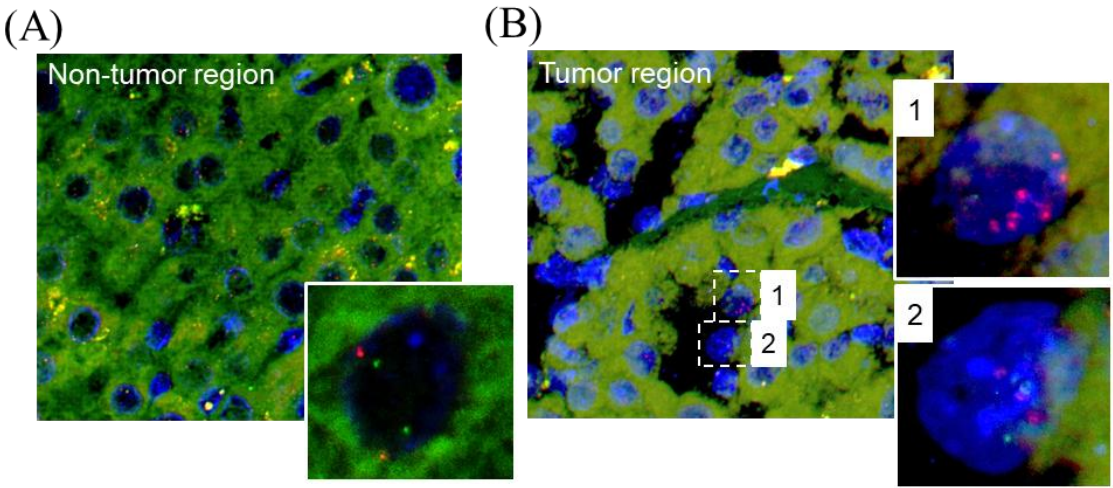


Figure 5. Two-color FISH analysis for Myc (red) and CEN7 (green) in the AA induced-liver non-tumor (A) and tumor (B) regions.