

研究課題名：香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究

研究代表者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

研究要旨

本研究では、香料化学物質の安全性を *in silico*、*in vitro*、*in vivo* で階層的に評価する評価系を構築し、食品香料の効率的かつ信頼性の高い安全性評価の推進に資することを目的とする。また、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法としての条件設定を行い、多施設で実施可能な標準法の確立を目指す。

I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

QSAR と Ames 試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究として、香料に特化したローカル QSAR モデル (Star Drop) の開発に取り組んだ。その結果、既存の商業ベースの Ames/QSAR モデルが示す予測率を上回る可能性のあるモデル構築に至る成果を得た。突然変異試験で相反する結果を示す物質 (Ames 試験陽性でげっ歯類発がん性試験陰性を示す 10 化合物、および Ames 試験陽性で QSAR 予測陰性を示すフラン化合物 1 種) について、ヒトリンパ芽球 TK6 細胞によるチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験 (OECD ガイドライン TG490) を実施した結果、前者は 10 物質中 2 物質が総合判定で陰性 (フォローアップ試験として 20%有効) であった。後者は陰性であった。トキシコプロテオミクスと組み合わせる TK6 アッセイは *in vitro* 特異的反応による偽陽性の結果を解釈するのに役立つ可能性があり、Ames 試験の偽陽性の減少に有効であると考えられた。得られたデータは、QSAR 予測性の向上、および専門家判断のための重要な遺伝毒性評価データとして資すると考えられる。アクリルアミド (AA) をモデル化合物として *gpt delta* マウスを用いたトランスジェニック遺伝子突然変異試験 (TGR 試験) を実施した結果、DNA 付加体量と遺伝子突然変異頻度は定性的には相関するが異なる用量反応性を示した。AA 発がんのメカニズムは特定の DNA 付加体による遺伝毒性 MoA のみでは十分説明できない可能性が示唆された。従来系統よりもレポーター遺伝子の回収効率が高い新規 *gpt delta* ラットの評価を行い、*in vivo* 遺伝子突然変異試験に有用であることを示した。*gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験の有用性を検討するため、本法を用いて acetamide の評価を実施した。一般毒性評価の結果、acetamide が肝臓及び造血器系組織に毒性影響を示すことが明らかとなった (NOAEL : 0.625%)。遺伝毒性評価の結果、acetamide は変異原性を示さないものの、肝臓において染色体異常を誘発することが明らかになった。発がん性評価の結果、発がん用量に一致して GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の有意な増加が認められた。本法を用いることで acetamide の一般毒性、遺伝毒性及び発がん性の包括的毒性評価が可能であった。また、新たに肝臓小核試験の有用性も確認された。 *In silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物として

3-acetyl-2,5-dimethylfuran の *in vivo* 遺伝毒性・発がん性を検討した。F344 *gpt delta* ラットに本剤を 13 週間強制経口投与し、一般毒性ならびに肝臓の遺伝毒性・発がん性を検索した。一般毒性に関しては体重、鼻腔、肝臓及び脂質代謝に影響を与える可能性が示唆された。遺伝毒性に関しては肝臓の *gpt* 変異体頻度は有意な高値を示したことから、ラット肝臓において変異原性を示すことが明らかとなった。発がん性に関しては、肝前がん病変の有意な増加が認められたことから、ラット肝発がん性を有する可能性が示された。本試験法は *in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物について、*in vivo* での遺伝毒性や発がん性を検証するための有益なモデルであると考えられた。

## II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究

マウス正常組織由来オルガノイドに対する *in vitro* での被験物質暴露による遺伝毒性試験および発がん性試験の妥当性検証を行った。遺伝毒性試験については、*gpt delta* マウスの大腸および肺由来オルガノイドを用いて遺伝毒性を示す 2 物質について評価した結果、処置濃度に対応した変異頻度の増加と *in vivo* における結果と矛盾のない変異スペクトルが確認された。発がん性試験においては、マウス背景系統として C57BL (B6) および BALB/c について、改変遺伝子として、野生型、*Trp53* ヘテロ欠失 (*Trp53* +/−)、*Trp53* ホモ欠失 (*Trp53* −/−)、CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (rasH2) マウスについて、肺および肝臓(胆管)オルガノイドを用いて、遺伝毒性発がん性のある 3 物質、非遺伝毒性発がん物質と非発がん物質を各 1 物質の検討を行った。オルガノイドに被験物質を処置した後ヌードマウス皮下に接種し、病理組織学的に発がん性を評価した。その結果、B6 あるいは BALB/c 背景の野生型および *Trp53*+/−マウス由来の肺あるいは肝臓(胆管)オルガノイドが高感受性であることが示された。オルガノイド培養および被験物質暴露法については標準操作手順書を作成し、常温下あるいは凍結状態で施設間の輸送を行い、多施設で実施可能であることを確認した。更に、マウス個体を用いる実験では腫瘍性病変が嫌発である胃について、そのオルガノイドに対する変異遺伝子の再構成と遺伝毒性発がん物質の組合せにより発がん性を示すことを明らかにした。

## 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 部長
安井 学	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
増村健一	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
石井雄二	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長
高須伸二	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官
小川久美子	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長
西川秋佳	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 客員研究員
今井俊夫	国立がん研究センター・研究所 動物実験部門長
落合雅子	静岡県立大学 客員共同研究員
戸塚ゆ加里	国立がん研究センター・研究所 がんモデル開発部門ユニット長
三好規之	静岡県立大学 食品栄養科学部 准教授
筆宝義隆	千葉県がんセンター・研究所 発がん制御研究部長
平田暁大	岐阜大学 応用生物化学科 助教

### A. 研究目的

本研究では、香料化学物質の安全性を *in silico*、*in vitro*、*in vivo* で階層的に評価する評価系を構築し、食品香料の効率的且つ信頼性の高い安全性評価の推進に資することを目的とする。QSAR (*in silico*)、Ames 試験、TK6 試験 (*in vitro*)、一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法 (*in vivo*) を階層的に組み合わせることにより、遺伝毒性及び発がん性を包括的評価することが可能だけでなく、各階層の結果から発がんに対する

遺伝毒性の寄与や、そのメカニズムを解析する。遺伝毒性が疑われる香料については *in vivo* 試験 (一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験) や肝臓または腎臓を標的とする遺伝毒性・発がん性中期包括試験による評価を行う。また、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法としての条件設定を行い、多施設で実施可能な標準法の確立を目指す。更に、従来の動物モデルでは腫瘍性病変が発生しづらい胃由来のオルガノイドに対する化学物質の反応性解析法の確立を目的とし技術基盤を構築する。

本研究班は上記の目的を達成するため、以下の研究に取り組んだ。

#### I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

##### 1) QSAR と Ames 試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究 (本間、杉山) :

食品香料は、一般に数十から数百種類混合して用いられることが多く、個々の香料の食品への添加量は数 ppt から数 ppm レベルである。変異原性の評価のための Ames 試験には数グラム程度の試験サンプルが必要であるため QSAR の適用が望まれるが、その精度が問題となる。本研究では QSAR で変異原性が予測された化合物について、実際に Ames 試験を実施し、QSAR 結果を検証するとともに、機械学習による独自の統計ベース QSAR モデル開発を目的とした。

##### 2) Ames 試験陽性のフォローアップのためのヒト TK6 細胞を用いた遺伝子変異試験による評価 (安井) :

細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験) と哺乳類の発がん性試験の間で矛盾する結果は、代謝、ゲノム構造、および DNA 修復システムによる種の違いが原因である可能性がある。上位試験であるヒト細胞を用いた突然変異試験は、Ames 試験で陽性判定となった時のフォローアップ試験として有利であると考えられている。本研究では、OECD ガイドライン TG490 で確立されたヒトリンパ芽球 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 アッセイ) を使用して、フォローアップ試験としての TK6 アッ

セイの有用性を明らかにすることを目的とする。

### 3) AOP と定量的評価を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化 (増村) :

OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法 (AOP)」を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指し、分子的初期イベントである DNA 初期損傷 (DNA 付加体形成) とこれに続くキーイベントである遺伝子突然変異誘発に関して、*in vivo* における量的相関性を検討する。既存の *gpt delta* ラット試験系の実験コストが高い欠点を改善するため、レポーター遺伝子の回収効率を高めた新規 *gpt delta* ラットの作出と評価を行う。

### 4) Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法による評価 (石井、高須、西川、小川) :

レポーター遺伝子導入動物を用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験の有用性を検討した。本研究では、過去に食品香料として用いられていた acetamide について一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験による評価を実施した。また、新たに *in vivo* での染色体異常を検出する肝臓小核試験を実施しその有用性を検討した。

### 5) 肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価 (高須、石井、西川、小川) :

食品香料化学物質の安全性を *in silico*、*in vitro*、*in vivo* で階層的に評価する評価系を構築することを目的に、*in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物を対象として、*in vivo* での遺伝毒性・発がん性を検討する。*In silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物としてリストアップされた 10 候補化合物のうち、げっ歯類において肝発がん性を示すことが知られるフラン環を基本骨格とする香気成分である 3-acetyl-2, 5-dimethylfuran を被験物質として遺伝毒性・発がん性包括的試験による *in vivo* での評価を行った。

## II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する

## 研究 (今井、落合、戸塚、三好、筆宝、平田)

レポーター遺伝子導入マウスから3次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質を検出し、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウスあるいはshRNAにより発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系を用いることで既知の発がん物質による造腫瘍性あるいは上皮細胞の重層化・浸潤性・異型性の誘発を指標とする発がん性物質を検出する方法を確立することを目的とする。加えて、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立することとした。更に、マウス個体を用いる実験では腫瘍性病変が嫌発である胃についても、正常組織由来オルガノイドを用いることで、化学物質の発がん性が検出可能か検討を行った。

遺伝毒性試験については、*gpt delta* マウスから大腸および肺オルガノイドを調製した。発がん性については、平成 30 年度に BALB/c 背景および C57BL (B6) 背景の *Trp53* ヘテロ欠失 (*Trp53* +/−) および野生型マウス、令和元年度は CByB6F1- Tg (HRAS)2Jic (rasH2) および nonTg マウス、令和 2 年度は B6 背景の *Trp53* ホモ欠失 (*Trp53* −/−)、*Trp53* +/− および野生型マウスから肺および肝臓 (胆管) オルガノイドを調製して系統間の比較を行った。胃オルガノイドについては、発がんに関連する変異遺伝子の再構成による発がん性、ならびに *Trp53* コンディショナルアレレルホモ欠失 (*p53<sup>fl/fl</sup>*) マウスおよび *Apc* コンディショナル truncation ホモ変異マウス (*Apc<sup>580S/fl</sup>*) との二重変異マウスのオルガノイドを用いて化学物質による発がん性について検討した。

## **B. 研究方法**

### I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

#### 1) QSAR と Ames 試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究 (本間、杉山) :

商業ベースの Ames/QSAR モデルを用いて食品香料化合物データベース収載物質 3942 種類の

香料について変異原性を予測し、変異原性の懸念があるものについて Ames 試験を行ないデータベースの拡大と堅牢化を進めた。それらのデータを基盤に、Auto-Modeller™を用いて機械学習による独自の統計ベース QSAR モデル開発を行なった。

#### 2) Ames 試験陽性のフォローアップのためのヒト TK6 細胞を用いた遺伝子変異試験による評価 (安井) :

突然変異試験で相反する結果を示す物質 (Ames 試験陽性でげっ歯類発がん性試験陰性を示す 10 化合物、および Ames 試験陽性で QSAR 予測陰性を示すフラン化合物 1 種) について、上位試験である TK6 アッセイで調べた。前者は、日本環境変異原学会 MMS 共同研究で実施した。後者は、以下に示す Ames 試験と QSAR 予測結果が一致するフラン類 2 種を含め、計 3 種のフラン化合物の TK6 アッセイを実施した。

- ・ 3-Acetyl-2,5-dimethylfuran (Cas; 10599-70-9) ; Ames 試験陽性、QSAR 予測陽性
- ・ 4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Cas; 4166-20-5) ; Ames 試験陽性、QSAR 予測陰性
- 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone (Cas; 4077-47-8) ; Ames 試験陰性、QSAR 予測陰性

#### 3) AOP と定量的評価を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化 (増村) :

雄 *gpt delta* マウスにアクリルアミド (AA) (30, 100, 300 ppm) を 28 日間飲水投与して最終投与 3 日後に組織を採取した。肝臓、肺、精巣の DNA 付加体量と *gpt* 遺伝子突然変異体頻度を測定して用量反応データを取得し、ベンチマークドーズ法により PoD を算出した。ΔEG10 をホモに持った新規 *gpt delta* ラット (Wistar Hannover) を作出し、レポーター遺伝子回収効率を評価した。BaP (62.5, 125 mg/kg、28 日間強制経口投与)、ENU (50mg/kg、5 日間腹腔内投与) を投与し、突然変異頻度の測定と変異スペクトルの解析を

行った。

#### 4) Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法による評価 (石井、高須、西川、小川) :

4 週間の用量設定試験の後、F344 系 *gpt delta* ラットに acetamide を 0.6、1.25 及び 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与し、一般毒性評価 (一般状態観察、体重、摂餌量、臓器重量、血液学的検査、血清生化学的検査及び病理組織学的検索)、遺伝毒性評価 (*gpt* assay、Spi assay 及び肝臓小核試験) 及び発がん性評価 (免疫組織化学染色法による GST-P 陽性細胞巢の検索) を実施した。また、肝臓小核試験の標準プロトコールに従い、acetamide を F344 ラットに 0.6、1.25 及び 2.5% の濃度で 4 週間混餌投与し肝臓及び骨髄小核試験を実施し、包括試験における肝臓小核試験の結果と比較した。

#### 5) 肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価 (高須、石井、西川、小川) :

用量設定試験として雄性 F344 ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を最大 540 mg/kg の濃度で 28 日間強制経口投与した。その結果に基づき、本試験として雄性 F344 *gpt delta* ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を最大 300 mg/kg の用量で 13 週間強制経口投与し、一般毒性評価ならびに肝臓を対象とした遺伝毒性・発がん性の検索を実施した。遺伝毒性評価では肝臓の *gpt* assay による検索を、発がん性評価では肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による検索を実施した。

#### II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究 (今井、落合、戸塚、三好、筆宝、平田)

(A) マウス正常組織からのオルガノイド樹立および樹立したオルガノイドに対する化学物質の *in vitro* 暴露

##### 1) マウス系統

- i) 遺伝毒性試験 : *gpt delta* マウス (雄、5 週齢)
- ii) 発がん性試験 : B6 あるいは BALB/c 背景の野生型、*Trp53* +/- および *Trp53* -/- マウス、およ

びrasH2、nonTgマウス（いずれも、雄、5週齢）  
iii) 胃の発がん実験： *Trp53*のコンディショナルアレルのホモ欠失マウス (*p53<sup>fl/fl</sup>*)、*Kras*のコンディショナルアレルのヘテロマウス (*Kras<sup>LSL-G12D/+</sup>*)、*Rosa26-Pik3ca*コンディショナル変異アレルのノックインヘテロマウス (*R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>*)、*Apc*のコンディショナル truncation ホモ変異マウス (*Apc<sup>580S<sup>fl/fl</sup></sup>*) および *p53<sup>fl/fl</sup>*; *Apc<sup>580S<sup>fl/fl</sup></sup>* 二重変異マウスを用いた。

## 2) オルガノイドの調製

マウスを安楽死させた後、肺および肝臓を摘出し、細切・酵素処理してオルガノイドを調製した。培養にはマトリゲル重層オルガノイド培養 (MBOC) 法を用いた。オルガノイドの培養法については標準操作手順書を作成し、各施設では本手順書に従って培養を行った。

## 3) オルガノイドの輸送

12ウェルプレートに播種、培養中の状態から培地のみを除き、重層したマトリゲル中でオルガノイドを常温維持して宅配便により輸送した。また、CELLBANKER2 (ゼノアックリソース) を用いて凍オルガノイドを結保存し、ドライアイス中に梱包、冷凍状態で宅配便により輸送した。

## 4) 被験物質

i) 遺伝毒性試験：2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-*b*]ピリジン (PhIP:対象臓器、大腸)、アクリルアミド (AA:同、肺)

ii) 発がん性試験：

・遺伝毒性発がん物質

メタンスルホン酸エチル (EMS) メチルニトロソ尿素 (MNU: 以上の対象臓器、肺および肝臓 (胆管))、アクリルアミド (AA: 対象臓器、肺)、ジエチルニトロソアミン (DEN: 同、肝臓 (胆管))

・非遺伝毒性発がん物質

アセトアミド (同、肺および肝臓 (胆管))

・非発がん物質

・安息香酸ナトリウム (同、肺および肝臓 (胆管))

## 5) 各被験物質の処置濃度

遺伝毒性試験および発がん性試験における被験物質の濃度は、試験実施前に96ウェルプレート

に播種したオルガノイドに対し、0~4 mM (+S9 mix 添加:MNUを除く)にて24時間暴露した後、RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (プロメガ) により生細胞数を測定し決定した。

## 6) オルガノイドへの被験物質暴露

肺および肝臓 (胆管) オルガノイドは12ウェルプレートで培養し、約1週間毎の継代の際、1日目の播種後に培地に被験物質を添加、24時間暴露後の2日目にPBSで洗浄後マトリゲルを重層し培養を継続した。被験物質処置は連続3回の継代時に行った。被験物質曝露法については標準操作手順書を作成し、各施設では本手順書に従って処置した。

## (B) 遺伝毒性試験

### 1) 変異原性試験

オルガノイドからDNAを抽出し、*in vitro*パッケージングによってトランスジーンλEG10をファージ粒子として回収、Creリコンビナーゼを発現している大腸菌YG6020株に感染させることによりプラスミドに転換させた。感染後のYG6020菌液を6-thioguanin (6-TG) とchloramphenicol (Cm) を含むM9寒天培地にて培養することで、*gpt*遺伝子が不活化している変異体のコロニーを形成させた。この変異コロニー数については、Cmを含むM9寒天培地にて形成された形質転換コロニー数で除して突然変異頻度を算出した。

### 2) 変異スペクトルの解析

1) で得られた変異コロニーのシーケンス解析を行い、変異スペクトルを解析した。

## (C) 発がん性試験

### 1) オルガノイドのヌードマウス皮下への接種

被験物質を*in vitro*にて暴露させた後、オルガノイドの継代・培養を3回程度繰返して細胞数を増やした。オルガノイドとマトリゲルを回収し、等量のマトリゲルを追加混和した後、ヌードマウスの皮下にイソフルランによる麻酔下にて接種した。接種は、1ウェル分のオルガノイドを背部1カ所に、マウス1匹あたり左右2カ所とした。

2) 皮下に接種したオルガノイドに対する病理組織学的評価

接種8週後に熟練した技術者によりヌードマウ

スを頸椎脱臼により安楽死させた後、皮下から結節/腫瘍あるいはオルガノイド接種部位を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定後、常法にてパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

(D) マウス胃由来オルガノイドの樹立と化学発がん

#### 1) 遺伝子異常の再構成

レンチウイルスベクターとしてpLKO.1の骨格にCreおよび shRNAを組み込んだものを使用した。オルガノイドの感染は単一細胞にまで分散させた上で、マトリゲル上で一晩共培養することで行った。当該遺伝子の組替えはゲノムPCRで確認し、標的遺伝子のノックダウンはぴゅーろマイシンによる薬剤選択後にウェスタンブロット解析で確認した。

#### 2) 化学発がん

被験物質としてMNUと7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン(DMBA)を用いた。遺伝子改変後の胃オルガノイドに対し、前述の発がん性試験と同様の手順で行った。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、各研究施設の規定に従って動物実験倫理委員会の承認を得た後に実施した。実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認を得た後に実施した。

### C. 研究結果

#### I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

##### 1) QSARとAmes試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究(本間、杉山):

当該研究により得られたAmes試験結果を活用

することでAmes試験データベースの精緻化と拡充化を行った。このデータベースを利用して開発したローカルQSARモデル(Star Drop)は他の商業QSARモデル(Derek Nexus及びCASE Ultra)よりも感度・特異度・正確度のいずれにおいても優れたパフォーマンスを示すことを明らかにした。

##### 2) Ames試験陽性のフォローアップのためのヒトTK6細胞を用いた遺伝子変異試験による評価(安井):

突然変異試験で相反する結果を示す10物質中2物質が総合判定で陰性であった(フォローアップ試験として20%有効)。8つの陽性物質のうち、4-ニトロアントラニル酸で処理されたTK6細胞のトキシコプロテオミクスを実施した結果、24時間処理後に発現差のあるタンパク質が、*in vitro* 特異的酸化ストレスに関与していることを確認した。Ames試験陽性でQSAR予測陰性を示す4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanoneは、TK6アッセイでは陰性であった。

##### 3) AOPと定量的評価を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化(増村):

AA投与群のDNA付加体量は用量依存的に直線的な増加を示した。変異頻度は陰性対照群と比較して有意に増加したが、高用量群では頭打ちの傾向を示した。BMD信頼区間(BMDL-BMDU)は付加体量、変異頻度、発がん概ね重なっていた。新規gpt delta rat(homo)は従来系統と比較してレポーター遺伝子回収効率が5倍高く、BaPおよびENU投与によってgpt突然変異体頻度の有意な増加と、特徴的な塩基置換変異の誘発を示した。トランスジーン $\lambda$ EG10がラット1番染色体にマルチコピーで導入されていることが確認された。

##### 4) Acetamideの一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法による評価(石井、高須、西川、小川):

一般毒性評価では、血清生化学検査の肝毒性パラメーターとともに、肝臓では1.25%から肝細胞の空胞化、有糸分裂像の増加、単細胞壊死、好塩

基性の細胞質内封入体、核の大小不同、オーバルセル過形成及び変異肝細胞巣が認められた。脾臓では、2.5%において赤芽球の減少が認められた。遺伝毒性評価では、いずれの投与群においても *gpt* 及び Spi-変異体頻度の有意な変化は認められなかったのに対し、肝臓小核試験では主核の 1/4 以下の通常の小核に加え 1/2~1/4 程の大型の小核が検出され、どちらも 1.25%から有意に増加した。発がん性評価では、肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巣の数及び面積が発がん用量の 1.25%から有意に増加した。肝臓小核試験の標準プロトコールである 4 週間投与における肝臓小核試験でも同様の傾向が認められ、骨髄小核試験は陰性だった。

#### 5) 肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価 (高須、石井、西川、小川) :

3-acetyl-2, 5-dimethylfuran の用量設定試験では 540 mg/kg/day 投与群で顕著な体重増加抑制、鼻出血、鼻腔嗅上皮の壊死が認められた。本試験においては、300 mg/kg 投与群において投与 1 週目から 2 週目に鼻出血がみられ、全投与期間を通じて有意な体重増加抑制が認められた。血清生化学検査の結果、30 mg/kg/day 以上の投与群において総蛋白、トリグリセリド、総コレステロール、リン脂質の有意な低値が認められた。300 mg/kg/day 投与群の肝臓の絶対および相対重量はいずれも有意な高値を示し、病理組織学的に軽度の小葉中心性肝細胞肥大、鼻腔嗅上皮の変性/壊死、呼吸上皮化生が認められた。300 mg/kg/day 投与群の *gpt* 変異体頻度は対照群に比して有意な高値を示し、GST-P 陽性細胞巣の数および面積は有意に増加した。

#### II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究 (今井、落合、戸塚、三好、筆宝、平田)

(A) マウス正常組織からのオルガノイド樹立および樹立したオルガノイドの培養

*gpt delta* マウス、B6あるいはBALB/c背景の野生型、*Trp53* +/-および*Trp53*-/-マウス、および*rasH2*、*nonTg*マウスの大腸、肺、肝臓(胆

管)由来オルガノイドは標準操作手順書に従った方法で、各施設において概ね所期のスケジュール通りに培養できた。

#### (B) 遺伝毒性試験

PhIPをS9mixの存在下にて0、5、10 μM濃度で大腸オルガノイドに曝露させたところ、変異頻度はPhIPの濃度に応じて上昇した。また変異スペクトルは、G:C>A:T, G:C>T:Aであり、既報の*gpt delta* マウスを用いた*in vivo*試験の結果と殆ど矛盾していなかった。肝臓では、PhIPの濃度に応じて変異頻度の上昇傾向が観察された。

AAをS9mixの存在下にて0、0.28、1.4 mM濃度で肺オルガノイドに曝露させたところ、1.4 mM濃度群で約4倍の変異頻度の上昇傾向がみられた。変異スペクトルについては、A:T > T:A, A:T > C:G、Insertion及びDeletionの増加が認められ、一部既報の*in vivo*試験の結果 (Ishii Y *et al. Mutagenesis* 30, 2015) と一致した。

#### (C) 発がん性試験

BALB/c背景およびB6背景の*Trp53*+/-および野生型マウス由来の肺および肝臓(胆管)オルガノイドを用いて、遺伝毒性発がん物質であるEMS、AAおよびDENを用いる解析を行った結果、顕著な系統差はみられなかった。また、陰性対照として用いた安息香酸ナトリウムによる変化は認められなかった。*Trp53*+/-および野生型マウスに加え、個体レベルでの*in vivo*発がん実験では遺伝毒性発がん物質に高感受性を示すが短期間でリンパ腫が発生し他臓器における発がん性が検出しづらい*Trp53*-/-マウスに対して遺伝毒性発がん物質のMNUと非遺伝毒性発がん物質とされるアセトアミドを用いる解析を行った結果、高感受性を期待した*Trp53*-/-マウス由来オルガノイドではMNU、アセトアミドともに明らかな影響がみられず、野生型および*Trp53*+/-マウス由来の特に肝臓(胆管)オルガノイドが高感受性を示す結果が得られた。

なお、*rasH2*マウスと*non-Tg*マウス由来の肺および肝臓(胆管)オルガノイドを用いて、EMS、AAおよびDENの解析を行ったが、*rasH2*マウ



ス由来肺および肝臓（胆管）オルガノイドは遺伝毒性発がん物質の *in vitro* 処置に対して軽度の発がん感受性を示すものの、*Trp53*+/-あるいは野生型マウス由来のオルガノイドに比しその感受性が低いことが示された。

(D) マウス胃由来オルガノイドの樹立と化学発がん

*Cdh1*に対するshRNAを用いたノックダウン、*Cre*による*Kras*<sup>G12D</sup>誘導、*Pic3ca*<sup>H1047R</sup>誘導、*Trp53*欠失などを単独または組合せて導入した後にヌードマウス皮下へ移植したところ、基本的に単一の遺伝子変異で腫瘍形成を認めることはなかった。一方、*Trp53*欠失に*Cdh1*ノックダウン、*Kras*<sup>G12D</sup>誘導、*Pic3ca*<sup>H1047R</sup>誘導を組合せると腺がんが誘導された。

化学発がんについては、遺伝子変異の再構成のみでは発がんには十分ではないものの、前がん病変は誘導可能である *Trp53* 欠失および *Trp53/Apc* 二重欠失胃オルガノイドを用いて検討した。MNU では明らかな変化はみられなかったが、DMBA を *Trp53/Apc* 二重欠失胃オルガノイド暴露したところ明らかな発がん促進効果が認められた。

## D. 考察

### I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究（本間、杉山、安井、増村、石井、高須、西川、小川）

今後、専門家により再評価されたデータなど質の高い情報を取り込むことで、開発したStarDrop QSAR モデルの特異性が向上する可能性がある。このような予測性能向上への取り組みを継続することは、将来的に実試験と遜色ない結果予測を得ることに繋がると考えられる。

トキシコプロテオミクスで見出された酸化ストレスに関連する発現変動タンパク質群は、同様に矛盾する試験結果を持つ他の化学物質でそれらのタンパク質が観察されるかどうかを確認するためにさらなる研究解析が必要である。TK6 アッセイは、Ames 試験と QSAR 予測で陽性物質（3-Acetyl-2,5-dimethylfuran）を陽性、そして

Ames 試験と QSAR 予測（Case Ultra）で陰性物質（2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone）を陰性と判定したことから、TK6 アッセイは精度が良く信頼性の高い試験であり、相反する結果を示す 4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone の結果が陰性であることからおそらく Ames 試験の結果は偽陽性であると考えられた。

遺伝毒性発がん AOP において、DNA 付加体形成と遺伝子突然変異誘発が定性的に相関する一方で、用量反応性が異なる特徴を示す場合があることが示唆された。AA 発がんのメカニズムは特定の DNA 付加体による遺伝毒性 MoA のみでは十分説明できない可能性が示唆された。LEG10 がホモに導入された新規 *gpt delta* ラットは、変異原が誘発する点突然変異の検出が可能であり、*in vivo* 遺伝子突然変異試験に有用であることが示唆された。

Acetamide の一般毒性評価では、血清生化学検査の肝毒性パラメーターとともに、1.25%から肝傷害性の変化が観察された。脾臓では赤芽球の減少が認められ、血液学的検査における赤血球系パラメーターの変化と一致した。これらの変化は 0.625%において認められなかったことから、本試験における無毒性量は 0.625%と考えられた。遺伝毒性評価では、acetamide は染色体異常を誘発することが明らかとなり、染色体を含む大型の小核の形成から異数性誘発物質と考えられた。また、骨髄小核試験は陰性だったことから、acetamide の染色体異常の誘発には肝臓における代謝活性化が寄与すると考えられた。発がん性評価の結果、発がん用量の 1.25%において GST-P 陽性細胞巢の増加が認められたことから、本法が肝発がん性評価に有用であることを確認した。肝臓小核試験は投与期間の延長によりわずかに検出感度の低下が認められたものの、包括試験への組み込みは可能と考えられた。

3-acetyl-2,5-dimethylfuran の用量設定試験において、540 mg/kg/day 投与群では顕著な体重増加抑制が認められたことから、本試験の最

高用量は 300 mg/kg/day に設定した。本試験において鼻出血、鼻腔嗅上皮の変性、呼吸上皮化が認められたことから、本物質が鼻腔嗅上皮を毒性標的とすることが明らかとなった。また、肝重量増加および小葉中心性肝細胞肥大が認められ、血清中のトリグリセリド、総コレステロール、リン脂質は用量依存的に低下したことから、肝臓および脂質代謝に影響を与える可能性が考えられた。遺伝毒性に関しては肝臓における *gpt* 変異体頻度は有意な高値を示したことから、ラット肝臓において変異原性を示すことが明らかとなった。さらに、GST-P 陽性細胞巢の有意な増加が認められたことから、肝発がん性を有する可能性が示された。本試験法は *in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物について、*in vivo* で検証するための有益なモデルであると考えられた。

## II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究 (今井、落合、戸塚、三好、筆宝、平田)

(A) マウス正常組織からのオルガノイド樹立および樹立したオルガノイドに対する化学物質の *in vitro* 暴露

オルガノイド系を用いる試験系は、基幹施設でのバンク化と多施設への常温あるいは凍結条件下での安定的輸送により普及可能であると考えられた。

(B) 遺伝毒性試験

AAの遺伝毒性については、染色体異常誘発性はあるものの、Ames試験ではS9 mixの存在の有無にかかわらず陰性であることが示されている。一方、本研究課題において、*gpt delta*マウスの肺由来オルガノイドを用いた検討を行った結果、AA処置により変異頻度の上昇が観察された。AAはCYP2E1により代謝され、Ames試験で陽性を示すグリシドアミドに変化することが示されている。一方、今回のオルガノイドを用いる試験でも用いたS9 mixにはCYP2E1が殆ど含まれていない。現在、マウスの正常肺由来オルガノイドにおけるCYP2E1の発現量解析を行っている。

(C) 発がん性試験

B6あるいはBALB/c背景の野生型および *Trp53* +/-マウス由来の肺あるいは肝臓 (胆管) オルガノイドが遺伝毒性発がん物質および一部の非遺伝毒性発がん物質に高感受性であることが示された。一方、*Trp53* -/-マウス由来の肝臓 (胆管) オルガノイドはMNUに対し軽微な感受性を示したが、アセトアミドには非感受性であった。また、B6背景の *Trp53* -/-マウス由来の肺オルガノイドはアセトアミドに対して軽微な感受性を示したが、*Trp53* +/-マウスと野生型マウス由来の肺オルガノイドは非感受性であった。更に、何れの系統マウス由来の肺オルガノイドにおいてもMNUには非感受性であり、肺オルガノイドについてはマウスの背景系統についての課題が残った。

(D) マウス胃由来オルガノイドの樹立と化学発がん

胃由来オルガノイドを用いる実験においては、*Kras* 変異単独では異型腺管を伴う腫瘍は誘導されなかったが、*Kras* 変異と *Trp53* 欠失の組合せを検討したところ、分化型腺がんが誘導されることを示した。これを受け、*Trp53* 欠失および *Trp53/Apc* 二重欠失胃オルガノイドを用いてMNUとDMBAの発がん性を検討した。その結果、*Kras* 変異とDBMA処置の組合せでは明らかな発がん性を示さなかったが、*Trp53/Apc* 二重欠失とDBMA処置の組合せで発がんが可視化することを示した。従来のマウス個体を用いるモデルでは検出が難しい胃発がんについて、今回、胃オルガノイドの変異遺伝子の再構成モデルと遺伝毒性発がん物質を組合せることで発がんが誘導できることを見出した。

以上、マウス正常組織由来オルガノイドを用いることにより、被験物質を *in vitro* にて処置する遺伝毒性試験法および発がん性試験法を確立することが可能であることを示した。一方、幅広い被験物質の解析を可能とするために更に使用するマウス系統や対象臓器を絞り込む必要があり、引続き検討が必要と考えられた。

## E. 結論

### I. 標準的安全性評価法の確立に関する研究

香料 Ames 試験データベースを構築するとともに、商業モデルよりも優れた予測性を示す可能性のあるローカル QSAR モデルを開発した。TK6 アッセイは精度が高く信頼性の高い試験であるが、プロテオミクスなどの新しい技術と組み合わせない方法の TK6 アッセイの有用性は、フォローアップ試験として限定的であることがわかった。しかし、それでも Ames 試験の偽陽性結果を減らす (20%) のに役立つと考えられた。オミクス技術と TK6 アッセイの統合は、*in vitro* 特異的な不規則な結果の解釈に寄与する可能性があり、Ames 試験のフォローアップで偽陽性をさらに減少させることにつながると考えられた。AA 投与 *gpt delta* マウスの組織において *gpt* 突然変異体頻度は有意に増加したが、DNA 付加体量および発がんとの用量相関性は低く、AA 発がんメカニズムは特定の DNA 付加体による遺伝毒性 MoA のみでは十分説明できない可能性が示唆された。試験の効率化のため、従来システムと比べてレポーター遺伝子回収効率が高い新規 *gpt delta* ラットを作出し、*in vivo* 遺伝毒性試験に有用であることを示した。Acetamide は 1.25% から肝臓及び造血器系組織に毒性影響を示すことが明らかとなり、本試験における無毒性量は 0.625% (394 mg/kg 体重/日に相当) と考えられた。肝臓で認められた acetamide の染色体異常はその肝発がん性への寄与を示唆するものと考えられた。また、GST-P 陽性細胞単の検索により化学物質の発がん性評価が可能であることが確認された。以上より、*gpt delta* ラットを用いた包括試験は香料の迅速かつ包括的な安全性評価に有用な試験法と考えられた。さらに、肝臓小核試験の包括試験への組み込みは、変異原性に加え染色体異常の評価を可能にする有用な手段と考えられた。3-acetyl-2,5-dimethylfuran の *in vivo* 遺伝毒性・発がん性を検討した結果、一般毒性に関しては体重、鼻腔、肝臓及び脂質代謝に影響を与える可能性が示唆された。遺伝毒性に関しては肝臓の *gpt*

変異体頻度は有意な高値を示したことから、ラット肝臓において変異原性を示すことが明らかとなった。発がん性に関しては、肝前がん病変の有意な増加が認められたことから、ラット肝発がん性を有する可能性が示された。本試験法は *in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物について、*in vivo* での遺伝毒性や発がん性を検証するための有益なモデルであると考えられた。

### II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究

マウス正常組織由来オルガノイドに対する *in vitro* での被験物質暴露による遺伝毒性試験および発がん性試験の妥当性検証を行った。遺伝毒性試験については、*gpt delta* マウスの大腸および肺由来オルガノイドを用いて遺伝毒性を示す 2 物質について評価した結果、処置濃度に対応した変異頻度の増加と *in vivo* における結果と矛盾のない変異スペクトルが確認された。発がん性試験においては、マウス背景システムとして C57BL (B6) および BALB/c について、改変遺伝子として、野生型、*Trp53* ヘテロ欠失 (*Trp53* +/−)、*Trp53* ホモ欠失 (*Trp53* −/−)、CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (rasH2) マウスについて、肺および肝臓 (胆管) オルガノイドを用いて、遺伝毒性発がん性のある 3 物質、非遺伝毒性発がん物質と非発がん物質を各 1 物質の検討を行った。オルガノイドに被験物質を処置した後ヌードマウス皮下に接種し、病理組織学的に発がん性を評価した。その結果、B6 あるいは BALB/c 背景の野生型および *Trp53*+/- マウス由来の肺あるいは肝臓 (胆管) オルガノイドが高感受性であることが示された。オルガノイド培養および被験物質暴露法については標準操作手順書を作成し、常温下あるいは凍結状態で施設間の輸送を行い、多施設で実施可能であることを確認した。更に、マウス個体を用いる実験では腫瘍性病変が嫌発である胃について、そのオルガノイドに対する変異遺伝子の再構成と遺伝毒性発がん物質の組合せにより発がん性を示すことを明らかにした。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Amberg A, Andaya RV, Anger LT, Barber C, Beilke L, Bercu J, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cross KP, Custer L, Dobo K, Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Gomez S, Van Gompel J, Harvey J, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kemper R, Kenyon M, Kruhlak N, Leavitt P, Miller S, Muster W, Naven R, Nicolette J, Parenty A, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Sasaki JC, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, Weiner S, Welch DS, White A, Wichard J, Woolley D, Myatt GJ. Principles and procedures for handling out-of-domain and indeterminate results as part of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018, S0273-2300(18)30314-3. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.12.007.
2. Myatt GJ, Ahlberg E, Akahori Y, Allen D, Amberg A, Anger LT, Aptula A, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Burden N, Cammerer Z, Cronin MTD, Cross KP, Custer L, Dettwiler M, Dobo K, Ford KA, Fortin MC, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gervais V, Glover KP, Glowienke S, Van Gompel J, Gutsell S, Hardy B, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Hughes K, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kim MT, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Majer B, Masten S, Miller S, Moser J, Mumtaz M, Muster W, Neilson L, Oprea TI, Patlewicz G, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Ruiz P, Schilter B, Serafimova R, Simpson W, Stavitskaya L, Stidl R, Suarez-Rodriguez D, Szabo DT, Teasdale A, Trejo-Martin A, Valentin JP, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Hasselgren C. In silico toxicology protocols. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018, 96:1-17. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.04.014.
3. Mishima M, Hashizume T, Haranosono Y, Nagato Y, Takeshita K, Fukuchi J, and Homma M. Meeting report, ICH M7 relevant workshop: use of (Q)SAR systems and expert judgment. *Genes and Environment* (2018) 40:19. doi.org/10.1186/s41021-018-0107-2
4. Benfenati E, Golbamaki A, Raitano G, Roncaglioni A, Manganelli S, Lemke F, Norinder U, Lo Piparo E, Honma M, Manganaro A, Gini G. A large comparison of integrated SAR/QSAR models of the Ames test for mutagenicity. *SAR QSAR Environ Res.* 2018, 29(8):591-611. doi: 10.1080/1062936X.2018.1497702.
5. Honma M, Kitazawa A, Cayley A, Williams RV, Barber C, Hanser T, Saiakhov R, Chakravarti S, Myatt GJ, Cross KP, Benfenati E, Raitano G, Mekenyan O, Petkov P, Bossa C, Benigni R, Battistelli CL, Giuliani A, Tcheremenskaia O, DeMeo C, Norinder U, Koga H, Jose C, Jeliaskova N, Kochev N, Paskaleva V, Yang C, Daga PR, Clark RD, Rathman J. Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity: outcomes of the Ames/QSAR International Challenge Project. *Mutagenesis.* 2019, 34(1):3-16. doi:10.1093/mutage/gey031.
6. Fukuchi J, Kitazawa A, Hirabayashi K,

- Honma M. A practice of expert review by read-across using QSAR Toolbox. *Mutagenesis*. 2019 Mar 6;34(1):49-54. doi:10.1093/mutage/gey046.
7. Petkov PI, Schultz TW, Honma M, Yamada T, Kaloyanova E, Mekenyan OG. Validation of the performance of TIMES genotoxicity models with EFSA pesticide data. *Mutagenesis*. 2019, 34(1):83-90. doi: 10.1093/mutage/gey035.
  8. Tennant RE, Guesné SJ, Canipa S, Cayley A, Drewe WC, Honma M, Masumura K, Morita T, Stalford SA, Williams RV. Extrapolation of in vitro structural alerts for mutagenicity to the in vivo endpoint. *Mutagenesis*. 2019, 34(1):111-121. doi: 10.1093/mutage/gey030.
  9. Morita T, Shigeta Y, Kawamura T, Fujita Y, Honda H, Honma M. In silico prediction of chromosome damage: comparison of three (Q)SAR models. *Mutagenesis*. 2019, 34(1):91-100. doi: 10.1093/mutage/gey017.
  10. Amberg A, Anger LT, Bercu J, Bower D, Cross KP, Custer L, Harvey JS, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Leavitt P, Quigley DP, Miller S, Snodin D, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, White AT, Wichard J, Myatt GJ. Extending (Q)SARs to incorporate proprietary knowledge for regulatory purposes: is aromatic N-oxide a structural alert for predicting DNA-reactive mutagenicity? *Mutagenesis*. 2019, 34(1):67-82. doi: 10.1093/mutage/gey020.
  11. 本間正充 ; 医薬品中の変異原性不純物の安全性評価と管理—ICH-M7 を踏まえた遺伝毒性物質の許容値の設定に関する科学— PHARM TECH JAPAN 35(8), 1461-1469, 2019.
  12. 本間正充 ; 食品中に混在する微量な化学物質の安全性評価 — 定量的構造活性相関 (QSAR) による変異原性化学物質の同定— 日本包装学会誌 29 (1), 27-42, 2020
  13. 本間正充 ; 化学物質の遺伝毒性評価と定量的構造相関 ((Q) SAR) ポリ衛協会報 65, 5-25, 2019
  14. 本間正充 ; 毒性試験の未来を考える — (定量的) 構造活性相関による化学物質の変異原性評価 — 国立医薬品食品衛生研究所報告 137, 20-31, 2019
  15. Hasselgren C, Ahlberg E, Akahori Y, Amberg A, Anger LT, Atienzar F, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cronin MTD, Crooks I, Cross KP, Custer L, Dobo K, Doktorova T, Faulkner D, Ford KA, Fortin MC, Frericks M, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Barton-Maclaren TS, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Masten S, Miller S, Moudgal C, Muster W, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Schilter B, Snyder RD, Stavitskaya L, Stidl R, Szabo DT, Teasdale A, Tice RR, Trejo-Martin A, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Myatt GJ. Genetic toxicology in silico protocol. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2019 Oct; 107:104403. doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104403.
  16. Petko I, Petkov, Chanita Kuseva, Stefan Kotov, Masamitsu Honma, Airi Kitazawa, Sunil Kulkarni, Terry W. Schultz, Ovanes G. Mekenyan. Procedure for toxicological predictions based on mechanistic weight of

- evidences: Application to Ames mutagenicity. *Computational Toxicology* 12, 2019; doi.org/10.1016/J.COMTOX.2017.02.004
17. Honma M, Kitazawa A, Kasamatsu T, Sugiyama KI. Screening for Ames mutagenicity of food flavor chemicals by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes and Environment* 2020 42:32
  18. Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama KI, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M. Development of a new quantitative structure-activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ Auto-Modeller™. *Genes and Environment* 2021 in press.
  19. Sassa A, Fukuda T, Ukai A, Nakamura M, Takabe M, Takamura-Enya T, Honma M, Yasui M. Comparative study of cytotoxic effects induced by environmental genotoxins using XPC- and CSB-deficient human lymphoblastoid TK6 cells. *Genes Environ.* 41 :15 (2019).
  20. Yasui M, Fukuda T, Ukai A, Maniwa J, Imamura T, Hashizume T, Yamamoto H, Shibuya K, Narumi K, Fujiishi Y, Okada E, Fujishima S, Yamamoto M, Otani N, Nakamura M, Nishimura R, Ueda M, Mishima M, Matsuzaki K, Takeiri A, Tanaka K, Okada Y, Nakagawa M, Hamada S, Kajikawa A, Honda H, Adachi J, Misaki K, Ogawa K, Honma M ; Weight of evidence approach using a TK gene mutation assay with human TK6 cells for follow-up of positive results in Ames tests: a collaborative study by MMS/JEMS. *Genes Environ.* 43(1):7 (2021).
  21. You X, Ando T, Xi J, Cao Y, Liu W, Zhang X, Honma M, Masumura K, Luan Y. Gene mutation and micronucleus assays in *gpt* delta mice treated with 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether. *Mutagenesis*. 2018, 33:153-160
  22. Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. *In vivo* positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats. *Archives of Toxicology*. 2018, 92:3207-3221
  23. Aoki Y, Nakajima D, Matsumoto M, Yagishita M, Matsumoto M, Yanagisawa R, Goto S, Masumura K, Nohmi T. Change over time of the mutagenicity in the lungs of *gpt* delta transgenic mice by extract of airborne particles collected from ambient air in the Tokyo metropolitan area. *Genes and Environment*. 2018,40:25
  24. Hori H, Shimoyoshi S, Tanaka Y, Momonami A, Masumura K, Yamada M, Fujii W, Kitagawa Y. Integration of micronucleus tests with a gene mutation assay in F344 *gpt* delta transgenic rats using benzo[*a*]pyrene. *Mutation Research*. 2019, 837:1-7
  25. Aoki Y, Matsumoto M, Matsumoto M, Masumura K, Nohmi T. Mutant frequency is not increased in mice orally exposed to sodium dichromate. *Food Safety*. 2019;7:2-10.
  26. Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline in F344 *gpt* delta transgenic rats.

- Mutagenesis. 2019;34:279-287.
27. Lynch AM, Eastmond D, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Marchetti F, Masumura K, Pacchierotti F, Schuler M, Tweats D. Targets and mechanisms of chemically induced aneuploidy. Part 1 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res.* 2019;847:403025.
  28. Pacchierotti F, Masumura K, Eastmond D, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Lynch AM, Schuler M, Tweats D, Marchetti F. Chemically induced aneuploidy in germ cells. Part II of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res.* 2019 Nov;848:403023.
  29. T Tweats D, Eastmond DA, Lynch AM, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Marchetti F, Masumura K, Pacchierotti F, Schuler M. Role of aneuploidy in the carcinogenic process: Part 3 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res.* 2019;847:403032.
  30. Hori H, Shimoyoshi S, Tanaka S, Momonami A, Masumura K, Yamada M, Fujii W, Kitagawa Y, Hayashi M. Multiple-endpoint genotoxicity assay for colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Mutat Res.* 2020;849:503130.
  31. Aoki Y, Taniguchi Y, Matsumoto M, Matsumoto M, Ohno M, Masumura K, Sasaki S, Tsuzuki T, Yamamoto M, Nohmi T. Oxidative-stress-driven *in vivo* mutagenesis induced by oral administration of potassium bromate in the small intestines of *gpt* delta mice. *Mutat Res.* 2020;850-851:503136.
  32. Masumura K, Yatagai F, Ochiai M, Nakagama H, Nohmi T. Effects of the *scid* mutation on X-ray-induced deletions in the brain and spleen of *gpt* delta mice. *Genes Environ.* 2020;42:19.
  33. Chen R, You X, Cao Y, Masumura K, Ando T, Hamada S, Horibata K, Wan J, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y. Benchmark dose analysis of multiple genotoxicity endpoints in *gpt* delta mice exposed to aristolochic acid I. *Mutagenesis.* 2020;geaa034.
  34. Ishii Y, Takasu S, Grúz P, Masumura K, Ogawa K, Nohmi T, Umemura T. The role of DNA polymerase  $\zeta$  in benzo[*a*]pyrene-induced mutagenesis in the mouse lung. *Mutagenesis.* 2021;geab007.
  35. Hagio S, Tsuji N, Furukawa S, Takeuchi K, Hayashi S, Kuroda Y, Honma M, Masumura K. Effect of sampling time on somatic and germ cell mutations induced by acrylamide in *gpt* delta mice. *Genes Environ.* 2021;43:4.
  36. 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.* 177, 431-440 (2020)
  37. Maru Y, Onuma K, Ochiai M, Imai T, Hippo Y. Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoids. *Cancer Sci.* 110, 858-866 (2019)
  38. Ochiai M, Yoshihara Y, Maru Y, Tetsuya M, Izumiya M, Imai T, Hippo Y. Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids.

- Carcinogenesis 40, 1142–1152 (2019)
39. Machida Y, Sudo Y, Uchiya N, Imai T. Increased susceptibility to mammary carcinogenesis and an opposite trend in endometrium in *Trp53* heterozygous knockout female mice by back-crossing the BALB/c strain onto the background C3H strain. *J. Toxicol. Pathol.* 32, 197-203 (2019)
  40. Naruse M, Masui R, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, Imai T. An organoid-based carcinogenesis model induced by *in vitro* chemical treatment. *Carcinogenesis* 41, 1444-1453 (2020)
  41. Matsuura T, Maru Y, Izumiya M, Hoshi D, Kato S, Ochiai M, Hori M, Yamamoto S, Tatsuno K, Imai T, Aburatani H, Nakajima A, Hippo Y. Organoid-based *ex vivo* reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 41, 490-501 (2020)
  6. 本間正充、(QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity and its application to risk assessment. 2018 Joint International Workshop "Progress of Genotoxicity Methods and Regulatory Acceptance, 2018/11/27
  7. Honma M., Improvement of Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) Tools for Predicting Ames Mutagenicity. 第47回欧州環境変異ゲノム学会 2019年19–23日
  8. 本間正充 ; ICH-M7(医薬品中の DNA 反応性不純物の評価と管理)に関するガイドライン、第74回MMS研究会定例会、2019年6月14日
  9. 本間正充 ; 重大な発がん性物質は変異原性物質である。変異原性物質は *in silico* で予測できる。従って、発がん性物質は *in silico* で予測できる。第46回日本毒性学会学術年会、2019年6月26–28日
  10. Honma M., Ames/QSAR International Challenge Project. 第6回アジア環境変異原学会、第48回日本環境変異原学会、2019年11月18–20日
  11. 本間正充 : 生活環境で極低レベルで摂取する遺伝毒性発がん物質の安全性評価と管理、日本環境変異原学会第49回大会 (2020.11)
  12. 安井学, 鶴飼明子, 福田隆之, 馬庭二郎, 山本春菜, 今村匡志, 藤島沙織, 大谷尚子, 成見香瑞範, 松崎香織, 岡田祐樹, 中川宗洋, 上田摩弥, 小川久美子, 本間正充 : Ames 試験陽性のフォローアップに関するチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験の有用性の検討 : MMS 共同研究の報告. 日本環境変異原学会第47回大会 (2018.11.2)
  13. 竹入章, 松崎香織, 田中健司, 小川久美子, 安井学, 本間正充, 三島雅之 : Ames 試験陽性のフォローアップとしての TK6 細胞を用いた $\gamma$ H2AX 評価系の有用性検討 ; MMS 共同研究オプション項目の報告. 日本環境変異原

#### 学会発表

1. 本間正充、医薬品中の変異原性不純物の安全性評価と管理 2018年 ISPE 日本支部年次大会、2018/5/24
2. 本間正充、Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity QSAR2018、2018/06/12
3. 本間正充 遺伝毒性の新たな動き第45回日本毒性学会学術年会、2018/7/20
4. 本間正充、Mutagens and carcinogens in Japanese food: evolution of prioritized risk 第49回米国環境変異ゲノミクス学会、2018/9/26
5. 本間正充、(QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity KNect365 Life Sciences Annual Meeting of Genotoxic Impurities、2018/10/24



- 学会第 47 回大会 (2018.11.1)
14. 安井学, 福田隆之, 鶴飼明子, 馬庭二郎, 山本春菜, 今村匡志, 藤島沙織, 大谷尚子, 成見香瑞範, 松崎香織, 岡田祐樹, 中川宗洋, 上田摩弥, 三崎健太郎, 足立淳, 小川久美子, 本間正充: Ames 陽性を示す 10 化学物質のフォローアップに関する TK 遺伝子変異試験の有用性の検討: MMS 共同研究の報告. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会 (2019.11.18)
  15. 竹入章, 松崎香織, 田中健司, 小川久美子, 安井学, 本間正充, 三島雅之: TK6 細胞における  $\gamma$ H2AX 評価は Ames 試験陽性の初期フォローアップとして有用である: MMS 共同研究追加項目. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会 (2019.11.20)
  16. 山本美佳, 大谷尚子, 安井学, 小川久美子, 本間正充: Ames 試験陽性のフォローアップとしての *in vitro* Comet assay の有用性の検討: MMS 共同研究オプション試験. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会 (2019.11.18)
  17. 安井学, 鶴飼明子, 本田大士, 山田雅巳, 鈴木孝昌; ヒト肝及びビラット肝 S9 の比較プロテオーム解析. 日本環境変異原学会第 49 回大会 (2020.11.27).
  18. 福田隆之, 鶴飼明子, 西村諒一, 中村真生, 佐々彰, 安井学; TK6 細胞を用いた *in vitro* 小核試験結果における MGMT 遺伝子発現の役割. 日本環境変異原学会第 49 回大会 (2020.11.27).
  19. 増村健一: IWGT 報告—Aneugen に関する試験. 日本環境変異原学会 MMS 研究会第 72 回定例会 (2018.6)
  20. 増村健一: Ames 試験陽性のフォローアップと *in vivo* 試験. 日本環境変異原学会 BMS 研究会第 57 回定例会 (2018.7)
  21. 増村健一, 安東朋子, 豊田尚美, 鶴飼明子, 能美健彦, 本間正充: マウス雄性生殖細胞と次世代個体ゲノムの点突然変異頻度の比較. 日本環境変異原学会第 47 回大会 (2018.11)
  22. 増村健一: 清涼飲料水中の六価クロムの安全性評価について. 第 16 回食品安全フォーラム (2018.12)
  23. Masumura K, Ando T, Ishii Y, Honma M: Dose response of DNA adduct formation and gene mutation induced by acrylamide in *gpt delta* mice. 50th annual meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS) (2019.09)
  24. Masumura K, Ando T, Toyoda-Hokaiwado N, Ukai A, Nohmi T, Honma M: Analyses of ENU-induced germ cell mutations in male mice and inherited germline mutations in the offspring. The 47th annual meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EEMGS) (2019.05)
  25. Masumura K, Ando T, Ukai A, Fujiwara S, Suzuki T, Yokose S, Takagi H, Nohmi T, Honma M: New strain of *gpt delta* transgenic rat is homozygous for transgene and highly improved packaging efficiency. The Joint Meeting of the 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) (2019.11)
  26. 増村健一: Detection of *de novo* germline mutations in the offspring of mutagen-exposed male mice by whole exome/genome sequencing. 日本放射線影響学会第 62 回大会 (2019.11)
  27. Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N, Ando T, Ukai A, Nohmi T, Honma M: Absence of selection against ENU-induced point mutations in male germ cells during transmission to the next generation. 49th Annual Meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society. San

- Antonio, USA. (2018.9)
28. 増村健一, 安東朋子, 鶴飼明子, 藤原聖, 横瀬重雄, 高木久宜, 能美健彦, 本間正充: 遺伝子突然変異試験において高いレポーター遺伝子回収効率を実現する新規 *gpt delta* ラット. 第 79 回日本癌学会学術総会 (2020.10)
  29. 増村健一, 安東朋子, 石井雄二, 杉山圭一, 本間正充: アクリルアミド投与 *gpt delta* マウスを用いた DNA 付加体と点突然変異の用量相関に関する研究. 日本環境変異原学会第 49 回大会 (2020.11)
  30. 石井雄二, 菊池玲美花, 木島綾希, 高須伸二, 小川久美子, 梅村隆志「F344 ラットを用いたアセタミドの 28 日間反復投与による肝毒性評価」第 35 回日本毒性病理学会学術集会 (2019 年 2 月)
  31. 中村賢志, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 石井雄二, 小川久美子「レポーター遺伝子導入動物を用いた包括的毒性試験法による acetamide の評価」第 5 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2019 年 9 月)
  32. 中村賢志, 石井雄二, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「*gpt delta* ラットを用いた acetamide のラット肝発がんメカニズムに関する検討」第 36 回日本毒性病理学会学術集会 (2020 年 2 月)
  33. 中村賢志, 石井雄二, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「Acetamide のラット肝発がん過程における染色体異常及び DNA 損傷の関与」第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020 年 6 月)
  34. 中村賢志, 石井雄二, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「染色体異常により誘発される小核形成を介した acetamide の肝発がん機序の検討」日本環境変異原学会第 49 回大会 (2020 年 11 月)
  35. 中村賢志, 石井雄二, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「染色体異常を起点とする acetamide の肝発がん機序の検討」第 37 回日本毒性病理学会学術集会 (2021 年 2 月)
  36. 今井俊夫, 成瀬美衣, 落合雅子, 筆宝義隆: マウス大腸オルガノイドにおける PhIP 誘発発がん早期過程における遺伝子変異. 第 65 回日本実験動物学会総会 (2018 年 5 月)
  37. 今井俊夫, 成瀬美衣, 落合雅子, 筆宝義隆: マウス正常上皮組織由来オルガノイドの化学発がん物質に対する反応性. 第 25 回日本がん予防学会総会 (2018 年 6 月)
  38. 成瀬美衣, 落合雅子, 筆宝義隆, 今井俊夫: マウス正常上皮オルガノイドを用いた化学発がん過程の初期変化. 第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018 年 7 月)
  39. 今井俊夫: 新規 *in vivo, in vitro* モデルの発展とその応用—マウス正常組織由来オルガノイドの化学発がん研究への応用. 第 35 回日本毒性病理学会学術集会シンポジウム 2 (2019 年 2 月)
  40. Imai, T., Ochiai, M., Naruse, M., Hippo, Y.: Carcinogenic alteration of mouse tissue-derived organoids by chemical treatment. 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (2019年3月)
  41. 今井俊夫, 増井亮一, 中西もも, 中西るり, 町田雪乃, 成瀬美衣: BALB/c 背景 p53(+/-) マウス乳腺オルガノイドに対する DMBA の発がん作用. 第 66 回日本実験動物学会総会 (2019 年 5 月)
  42. Imai T, Masui R, Nakanishi R, Machida Y, Ochiai M, Naruse M: *In vitro* treatment of DMBA to murine mammary tissue-derived organoids induced adenocarcinomas/squamous cell carcinomas after their subcutaneous injection to nude mice. EuroTox 2019 (2019 年 9 月)
  43. 今井俊夫, 町田雪乃, 落合雅子, 成瀬美衣: DMBA の *in vitro* 処置により誘発されたマウス乳がんの遺伝子変異解析. 第 78 回日本癌学会学術総会 (2019 年 9 月)
  44. 今井俊夫, 町田雪乃, 成瀬美衣: マウス正常乳腺組織由来オルガノイドの特性. 第 37 回日本毒性病理学会学術総会 (2021 年 1 月)

45. 筆宝義隆 (招待講演) マウスおよび患者由来のがんオルガノイドモデル確立と創薬への応用、日本学術会議シンポジウム「創薬を加速させる革新的な細胞・臓器・個体モデル」、2021年1月18日
46. 筆宝義隆 3次元オルガノイド培養を用いたがんの本態解明と個別化医療・創薬への応用、(株)情報機構 細胞培養セミナー 2020年12月3日
47. 星大輔、中谷一真、丸喜明、筆宝義隆 様々な遺伝子変異の協調によるマウス腸オルガノイドからの発がん誘導、第79回日本癌学会学術総会 2020年10月1-3日
48. 丸喜明、筆宝義隆 オルガノイド発がんモデルが明らかにする子宮内膜の発がんおよび転移促進的な遺伝学的相互作用、第79回日本癌学会学術総会 2020年10月1-3日
49. 筆宝義隆 オルガノイドを用いた *ex vivo* 発がんモデルの確立とがん予防への応用 第27回日本がん予防学会総会 2020年9月15-16日
50. 筆宝義隆 Organoid Models for Reconstitution of Carcinogenesis and Implementation of Precision Medicine 熊本大学発生医学研究所 2020年2月21日
51. 吉原靖典、丸喜明、筆宝義隆 マウスオルガノイドを用いた胃発がんモデルの確立 第78回日本癌学会学術総会 2019年9月
52. 筆宝義隆 オルガノイドモデルによる臓器横断的な発がん過程の再構成 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会 2019年9月5日
53. 星大輔、喜多絵美里、丸喜明、筆宝義隆 膵腺房細胞癌のオルガノイド培養 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会 2019年9月5日
54. 筆宝義隆 3次元オルガノイド培養を用いたがんの本態解明と個別化医療・創薬への応用 (株)情報機構 細胞培養セミナー 2019年8月
55. 丸喜明、筆宝義隆 マウス胃オルガノイドへの包括的な遺伝子導入による胃発がん過程の再現 第16回がんとハイポキシア研究会 2018年11月
56. 筆宝義隆 オルガノイド培養を用いた発がんの再構成 神奈川県立がんセンター臨床研究所セミナー 2018年11月
57. 丸喜明、筆宝義隆 マウス卵管由来オルガノイドを用いた高異型度漿液性卵巣癌に対する包括的な疾患モデル作製 第77回日本癌学会学術総会 2018年9月
58. 泉谷昌志、吉原靖典、丸喜明、落合雅子、松浦哲也、今井俊夫、筆宝義隆 変異遺伝子の *in vitro* 再構成による胆管細胞発がんの誘導 第77回日本癌学会学術総会 2018年9月
59. Daisuke Hoshi, Emiri Kita, Yoshiaki Maru, Taketo Yamaguchi, Wataru Takayama, Makiko Itami, Yoshitaka Hippo. Organoid culture of pancreatic acinar cell carcinoma 平成30年度文部科学省新学術領域研究先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会 2018年9月
60. 筆宝義隆 Past, present and future of organoid in cancer research 東京大学 先端科学技術研究センターシステム生物医学セミナー 2018年9月
61. 丸喜明、筆宝義隆 マウス胃細胞の3次元培養を用いた胃発がん過程の再現 第27回日本癌病態治療研究会 2018年5月
62. 戸塚ゆ加里、佐藤春菜、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、遠藤 治: 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第47回日本環境変異原学会 (2018年11月)
63. 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里: マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第47回日本環境変異原学会 (2018年11月)
64. Totsuka Y, Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 日本癌学会学術総会シンポジウム, (2019年9月)
65. 戸塚ゆ加里 NGS によるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望 第47回日本毒性学会学術年会シンポジウム (2020年6月)
66. 入澤祐太、平田暁大、酒井洋樹、今井俊夫: マウス正常組織由来オルガノイドの施設間輸送の最適条件の検討. 第36回日本毒性病理学会 (2020年2月)
67. 入澤祐太、平田暁大、酒井洋樹、今井俊夫: アクリルアミド暴露後の肺オルガノイドの病理組織学的変化. 第37回日本毒性病理学会 (2021年1月)

## G. 知的財産権の取得状況

特になし