

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）
OECD プログラムにおいて TG と DA を開発するための AOP に関する研究

令和 2 年度 分担研究報告書

発がん性試験の TG 及び発がん性の AOP 開発に関する研究

研究分担者 小川久美子

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 部長

研究分担者 西川 秋佳

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 客員研究員

研究要旨

毎年、国内外で数多くの新規化学物質が考案され、我々の日常生活に応用されている。一方、化学物質の発がん性評価は、1 群雌雄 50 匹の 3 用量群及び対照群を設けたげっ歯類を用いた 2 年間反復投与試験がスタンダードとされているが、時間的、コスト的及びヒトへの外挿性に関する議論から、その実施は限定的となりつつある。本研究では、より効率的な発がん性試験法の試験法ガイドライン（TG: Test Guideline）開発及び発がん機序に基づく発がん性評価法の基礎となる有害性発現経路（AOP: Adverse Outcome Pathway）の開発とともに、現在、経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）で進められている非遺伝毒性発がん性の“試験の実施と評価のための戦略的統合方式（IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment）”開発事業に発がんの専門家として協力して開発することを目的としている。

1990～2000 年代に名古屋市立大学のグループで開発され、既に厚生労働省の化学物質発がん性スクリーニングに採用されているラット肝中期発がん性試験を、IATA 論文内に紹介し、厚生労働省の職場における化学物質の発がん性スクリーニングで実施された試験結果について、論文化を進めることとなった。

日本製薬工業協会グループ（研究協力者 久田茂博士ほか）の協力を得て、医薬品のラットにおける非遺伝毒性発がん性の AOP に関する SPSF (Standard Project Submission Form) として提案した 13 件の AOP のうち、最もヒトへの外挿性が高いと考えられる「トリプシン阻害による膵腺房細胞腫瘍」に関する AOP について、AOP Wiki に登録した。

また、ホルムアルデヒドによる鼻腔発がんの機序について、AOP の考え方に沿って網羅的に情報収集し、その包括的考察を review として国際誌に公表した。

さらに、OECD で進められている非遺伝毒性発がん性の IATA 開発に関する専門家会議のサブグループ及び全体会合 web 会議に参画し、アッセイ系の評価に協力すると共に、本活動の検討方針に関する論文化に貢献した。

研究協力者

久田 茂 日本製薬工業協会

A. 研究目的

毎年、国内外で数多くの新規化学物質が考案され、我々の日常生活に応用されている。一方、化学物質の発がん性評価は、1群雌雄 50 匹の 3 用量群及び対照群を設けたげっ歯類を用いた 2 年間反復投与試験がスタンダードとされているが、時間的、コスト的及びヒトへの外挿性に関する議論から、その実施は限定的となりつつある。さらに、動物実験の 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement) に関する国際動向に呼応し、動物実験からヒト材料を用いた *in vitro* 試験、あるいは毒性作用機構に基づく安全性評価手法の開発が進められている。OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) においても、反復投与毒性、生殖発生毒性、感作性、発がん性などの毒性発現機構を明確にするために AOP (Adverse Outcome Pathway) を作成し、それらの情報を網羅した IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) により化学物質の行政的な安全性評価を推進する戦略を進めている。

本研究では、より効率的な発がん性試験法の TG 開発及び発がん機序に基づく発がん性評価法の基礎となる AOP の開発とともに、現在 OECD で進められている非遺伝毒性発がん性の IATA 開発事業に発がんの専門家として協力することを目的としている。

B. 研究方法

B.1. 発がん性試験の TG 開発 (小川)

1990~2000 年代に小川が在籍していた名古屋市立大学のグループで開発され、既に

厚生労働省の職場における化学物質の発がん性スクリーニングに採用されているラット肝中期発がん性試験について、データ公開に向けた取り組みを進める。

B.2. 発がん性の AOP 開発 (西川・小川)

(1)日本製薬工業会グループ(久田茂博士等)の協力を得て、OECD に提案した「ラットにおける非遺伝毒性発がん性 AOP に関する SPSF (Standard Project Submission Form)」について、対象を絞って AOP 化を進める。
(2)研究分担者の西川及び小川は、ラット、マウス及びハムスターに鼻腔腫瘍を誘発する化学物質に関連し、ホルムアルデヒドの発がん機序に関するデータを収集し論文文化を進める。さらに、鼻腔発がん全般の AOP についても論文文化を準備する。

B.3. 非遺伝毒性発がん性の IATA 開発への協力 (西川・小川)

非遺伝毒性発がん性 IATA 開発専門家会議の検討方針に関する論文作成について、web 会議等で討議に参加する。また、当該 IATA における 13 のアッセイブロックの内 2 つまたは 3 つを分担し、そのサブグループ会議に参画して各アッセイ系に関する情報の整理及びランキングパラメータの付与を提案し、スプレッドシートを作成する。

C. 研究結果

C.1. 発がん性試験の TG 開発 (小川)

ラット肝中期発がん性試験に関して、IATA 論文内に紹介した。また、厚生労働省の職場における化学物質の発がん性スクリーニングで実施された試験結果について、実施施設における論文文化による公表を推進したところ、3 施設中 1 施設は論文文化を進めることとなった。

C.2. 発がん性の AOP 開発 (西川・小川)

(1)平成 30 (2018)年度に、研究代表者(小島)を介して OECD に提案し、改訂を行った 13 件のラットにおける非遺伝毒性発がん性 AOP のうち、最もヒトへの外挿性が考えられる「トリプシン阻害による膵腺房細胞腫瘍」に関する AOP について、令和元(2019)年度に日本製薬工業会のグループとともに作成し、AOP Wiki に AOP316 として登録した。

(2)ホルムアルデヒドの鼻腔発がん機序について AOP の考え方に沿って情報収集を行い review としてまとめた。国際誌に投稿し、受理された。鼻腔発がん全般の AOP に関する論文も準備中である。

C.3. 非遺伝毒性発がん性の IATA 作成への協力 (西川・小川)

OECD で進められている非遺伝毒性発がん性の IATA 開発への協力の一環として、専門家会議の検討方針に関する論文作成に関する web 会議に参加した。論文 “Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens” は meeting reports として Archive of toxicology に受理・掲載された。

IATA 開発について、西川研究分担者は cell transformation, indicator of oxidative stress 及び resistance of apoptosis cell death のサブグループに、小川研究分担者は cell proliferation 及び resistance to apoptotic cell death のサブグループに参画し、アッセイブロックの評価を行っている。resistance to apoptotic cell death においては、西川研究分担者は、caspases assay 及び standard H&E assay に関して、小川研究分担者は、TUNEL

assay, Annexin V assay を分担し、これらに関する情報をスプレッドシートにまとめ、非遺伝毒性発がん性を評価するアッセイとしての可能性と限界について、サブグループで議論し、その内容を文書にまとめている。さらに、全体会議に参加し、他のブロックの進捗について情報収集を行った。

D. 考察

D.1. 発がん性試験の TG 開発 (小川)

引き続き非遺伝毒性発がん性の IATA 等への引用を目指し、論文公表などの情報発信が必要と考えられた。

D.2. 発がん性の AOP 開発 (西川・小川)

(1)OECD に提案した 13 件のラットにおける非遺伝毒性発がん性 AOP の SPSF のうち、AOP Wiki への掲載が終了している最もヒトへの外挿性が想定される「トリプシン阻害による膵腺房細胞腫瘍」については、AOP 化を目指す必要があると考えられた。

(2) AOP の考え方に基づいたホルムアルデヒドの発がん機序に関する review 論文を公表することで、細胞毒性及び酸化ストレスを介した鼻腔発がんの理解が深まることになったと考えられた。

D.3. 非遺伝毒性発がん性の IATA 開発への協力 (西川・小川)

OECDの非遺伝毒性発がん性のIATA開発においては、アッセイ系の評価が適切になされるよう、引き続き協力を続ける必要があると考えられた。

E. 結論

E.1. 発がん性試験の TG 開発 (小川)

ラット肝中期発がん性試験の OECD での TG 化そのものは困難であるが、日本で開発された本法の有用性について論文化などの形で紹介し、引き続き IATA への引用などで貢献する意義があると考えられた。

E.2. 発がん性の AOP 開発 (西川・小川)

(1)ラットにおける非遺伝毒性発がん性AOPとして提案した13件のSPSFのうち、1件がAOP Wikiに収載され、引き続き整備することが必要と考えられた。

(2) ホルムアルデヒドの発がん機序を多角的に考察したreview論文を公表することができた。細胞毒性を初動因子とした鼻腔発がんのAOP開発に関しては、酸化的ストレスに関する考察が重要と考えられた。

E.3. 非遺伝毒性発がん性の IATA 開発への協力 (西川・小川)

非遺伝毒性発がん性のIATA開発における検討方針に関する論文に貢献した。本方針に基づいて継続されているIATA開発に引き続き協力していくことが必要と考えられた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

- 1) Nishikawa A, Nagano K, Kojima H, Ogawa K. A comprehensive review of mechanistic insights into formaldehyde-induced nasal cavity carcinogenicity. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2021, 123, 104937.
- 2) Ishii Y, Takasu S, Grúz P, Masumura K, Ogawa K, Nohmi T, Umemura T. The Role of DNA Polymerase ζ in Benzo[a]pyrene-induced Mutagenesis in the Mouse Lung. *Mutagenesis.* 2021, doi:

10.1093/mutage/geab007. In press.

- 3) Nakamura K, Ishii Y, Takasu S, Ogawa K. A 90-day subchronic toxicity study of 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2021, doi: 10.1016/j.fct.2021.112041. In press
- 4) Ide T, Cho YM, Oishi Y, Ogawa K. Spontaneous adenolipoma of the mammary gland in a male F344 rat. *J Toxicol Pathol.* 2021, In press.
- 5) 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.* 2021, 43, 7. 2021. doi: 10.1186/s41021-021-00179-1.
- 6) Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu K-i, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m ciclesonide aerosol by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int. J Pharm*, 2021, 595: 120241.
- 7) Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato

- M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. *o*-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-*N*⁴-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 2021, 34, 912-919.
- 8) Matsushita K, Ishii Y, Kijima A, Takasu S, Kuroda K, Takagi H, Nohmi T, Ogawa K, Umemura T. Background data of 2-year-old male and female F344 *gpt* delta rats. *J Toxicol Pathol*. 2021, 34, 23-31.
- 9) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Cho YM, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K. Expression of stem cell markers as useful complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for γ -H2AX. *Arch Toxicol*. 2021, 95, 715-726.
- 10) Yamada T, Toyoda T, Ide T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Neuromuscular and vascular hamartoma of the small intestine in an F344 rat. *J Toxicol Pathol*. 2021, 34, 113-117.
- 11) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Specific expression of survivin, SOX9, and CD44 in renal tubules in adaptive and maladaptive repair processes after acute kidney injury in rats. *J Appl Toxicol*. 2021, 41, 607-617.
- 12) Ide T, Mizuta Y, Akagi JI, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Ogawa K, Cho YM. A 90-day repeated oral dose toxicity study of four stereoisomers of 2,4-dimethyl-4-phenyltetrahydrofuran, a synthetic flavoring substance, in F344 rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2020, 114, 104664.
- 13) Jacobs M, Colacci A, Corvi R, Vaccari M, Aguila MC, Corvaro M, Delrue N, Desaulniers D, Ertych N, Jacobs A, Luijten M, Madia F, Nishikawa A, Ogawa K, Ohmori K, Paparella M, Sharma AK, Vasseur P. Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens. *Arch Toxicol*. 2020, 94, 2899-923.
- 14) Takasu S, Ishii Y, Kijima A, Ogawa K, Umemura T. Furan induced characteristic glutathione S-transferase placental form-positive foci in terms of cell kinetics and gene expression. *Toxicol Pathol*. 2020, 48, 756-65.
- 15) 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, 431-40.
- 16) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. A novel *o*-toluidine metabolite in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 2020, 33, 1907-14.
- 17) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Itō A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of γ -H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol*. 2020, 33, 279-85.
- 18) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Comprehensive

- expression analysis of mRNA and microRNA for investigation of compensatory mechanisms in the rat kidney after unilateral nephrectomy. *J Appl Toxicol.* 2020, 40, 1373-83.
- 19) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Dose dependency of γ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with genotoxic and nongenotoxic bladder carcinogens. *J Appl Toxicol.* 2020, 40, 1219-27.
- 20) Furihata C, You X, Toyoda T, Ogawa K, Suzuki T. Using FFPE RNA-Seq with 12 marker genes to evaluate genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens. *Genes Environ.* 2020, 42, 15.
- F.2. 学会発表
- 1) 豊田武士、松下幸平、山田貴宣、赤木純一、森川朋美、小川久美子. 腎発がん物質早期検出指標としての γ -H2AXの応用可能性：用量相関性の検討. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催、(2021年1月)
- 2) 豊田武士、小川久美子. ラット膀胱粘膜における γ -H2AX形成を指標とした芳香族アミンの膀胱傷害性および発がん性評価. 第79回日本癌学会学術総会、広島県、(2020年10月)
- 3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子. オルト-トルイジン類似構造を持つ芳香族アミンによるラット膀胱傷害および遺伝子発現解析. 第47回日本毒性学会学術年会、Web開催、(2020年6月)
- 4) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、井手鉄哉、小川久美子. ラット肝臓標本を用いた肝発がん物質早期検出のためのバイオマーカーの探索. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催、(2021年1月)
- 5) 山田貴宣、原田賢吾、豊田武士、小川久美子、中山千里、田川義章、奥山学. SDラットに認められた真正半陰陽の一例. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催、(2021年1月)
- 6) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 急性腎障害から慢性腎臓病への進展におけるCD44の役割. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催、(2021年1月)
- 7) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. *o*-Anisidine曝露ラット尿中代謝物の探索. 日本環境変異原学会第49回大会、静岡県、(2020年11月)
- 8) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、齋島由二. RNAアプタマーを利用した組織再生を促進する新規機能性医用材料の創製に関する研究. 第58回日本人工臓器学会大会、高知県、(2020年11月)
- 9) 赤木純一、豊田武士、小川久美子. 肝発がん物質投与ラット肝細胞における γ -H2AX誘導と細胞増殖活性の相関. 第79回日本癌学会学術総会、広島県、(2020年10月)
- 10) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. *o*-Anisidine曝露ラット尿中代謝物の探索. がん予防学術大会2020、Web開催、(2020年9月)

- 11) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 腎虚血再灌流障害モデルラットを用いた急性腎障害から慢性腎臓病への進展メカニズムの解明. 第163回日本獣医学会学術集会、Web開催、(2020年9月)
- 12) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. mRNA-microRNA 統合解析を用いた腎代償性メカニズムの包括的解析. 第47回日本毒性学会学術年会、Web開催、(2020年6月)

G.知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし