

令和4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、化学物質安全対策室からの求めに応じ、化審法での人健康に関する有害性評価における*in silico*評価手法の新たな活用場面を提案することを目的としている。R4年度は、国内外のリスク評価機関における*in silico*評価手法の活用状況等を調査し、化審法において活用可能と考えられる方法及び場面があるかを検討した。

国内外のリスク評価機関における *in silico* 評価手法の活用状況等の調査では、国内外のリスク評価機関等での *in silico* 評価手法の活用状況、国際機関等による *in silico* 評価手法の開発状況、人健康に関する有害性評価に有用と考えられる毒性データベース、*in silico* 評価手法等を活用した最新の評価手法や評価の枠組み等に関する文献について各々調べ、その内容を整理した。欧州 REACH 規則では、事業者による REACH 登録での *in silico* 評価手法の活用状況についてここ数年内では大きな変化はなく、反復投与毒性や生殖発生毒性エンドポイントの動物試験に代わる手法としては read-across が主流であったが、その妥当性については課題があるケースが多いことがわかった。一方、ECHA では、2027 年までにすべての登録物質についてリスク管理の優先順位付けを行うことを目的として、グルーピングアプローチを用いた規制ニーズ評価を進めている。米国 TSCA では、規制当局である米国 EPA は新規化学物質の審査において従来より QSAR/read-across を活用した評価を行っており、New Approach Methodologies (NAM) の導入により、動物試験の要求及び資金を 2025 年までに 30%削減、2035 年までに全廃することとしている。2020 年には NAM 導入に向けたワークプランが公表されており、今後 NAM を活用した評価がより進んでいくと予想される。Read across については、海外では活発にケーススタディの実施やその共有による課題の洗い出しとそれに基づく対処法の検討が精力的に行われている状況を確認できた。また、データギャップの穴埋めのために NAM データの導入が進められている状況が確認された。

以上を踏まえ、Read across 及びグルーピングについては、理論的には化審法での評価項目となっている一般毒性、生殖発生毒性、遺伝毒性、発がん性に適用できると考えられた。類似性を含め妥当性がある評価結果が少ない現状から考えると、容易に活用できる方法ではないと思われるが、今後の本分担研究では、化審法のスクリーニング評価対象物質の中からケーススタディを実施し、類似物質候補の検索方法、化学構造や物化性状、代謝、毒性プロファイル等に関する情報収集の方法や、スクリーニング評価資料における情報の示し方、類似性や Read across/グルーピングの妥当性に関する説明方法について、スクリーニング評価での活用を前提とした検討を進めていく必要があると考えた。

## A. 研究目的

本分担研究は、化学物質安全対策室からの求めに応じ、化審法での人健康に関する有害性評価における*in silico*評価手法の新たな活用場面を提案することを目的としている。化審法のための人健康影響評価では、現在までに、新規化学物質の評価及び既存化学物質のスクリーニング評価における変異原性評価の支援として、Ames試験結果を推定するQSAR結果の評価者への提供や、他機関による信頼性が高いRead across評価結果の採用（既存化学物質のスクリーニング評価のみ）を行っているが、本分担研究は、その他に*in silico*評価手法の活用場面や活用方法があるかを検討するものである。

R4年度は、国内外のリスク評価機関における*in silico*評価手法の活用状況等を調査し、化審法において活用可能と考えられる方法及び場面があるかを検討した。

## B. 研究方法

*In silico* 評価手法の国内外での活用状況等の調査

（定量的）構造活性相関（Q）SAR や read across（RA）等の *in silico* 評価手法の活用状況等を把握するための調査を実施した。具体的には、食品安全委員会が作成した報告書「新たな時代に対応した評価技術の検討～化学物質の毒性評価のための（Q）SAR 及び Read across の利用～」\*が公表された2017年前後の国内外での *in silico* 評価手法の活用状況や、人健康に関する有害性評価に有用と考えられる毒性データベースの調査、*in silico* 評価手法等を活用した最新の評価手法や評価の枠組み等に関する文献調査を実施した。

\*[https://www.fsc.go.jp/senmon/sonota/index.data/wg\\_gijyutsu\\_kikaku\\_houkoku\\_1.pdf](https://www.fsc.go.jp/senmon/sonota/index.data/wg_gijyutsu_kikaku_houkoku_1.pdf)

調査内容は、以下の通りである：

（1）国内外のリスク評価機関等での *in silico* 評価手法の活用状況の調査

人健康に関する有害性評価に活用され

ているまたは活用が見込まれる *in silico* 評価手法について、国内外のリスク評価機関のウェブサイトや公表資料等に基づき、国内外のリスク評価機関等での活用状況（*in silico* 評価手法の種類、評価する毒性項目、活用目的（場面）とその具体的な方法、推定結果の採用に関する考え方等）を調査した。

（2）人健康に関する有害性評価に有用と考えられる毒性データベースの調査

化審法での人健康に関する有害性評価に有用と考えられる毒性データベースについて調査した。

（3）*in silico* 評価手法等を活用した最新の評価手法や評価の枠組み等に関する文献調査

国際機関や各国の評価機関等における化学物質管理で利用されている（あるいは今後利用される可能性がある）*in silico* 評価手法等を活用した最新の評価手法や評価の枠組み等に関する文献調査を行い、有用な文献について原著を入手し、概要を整理した。

化審法では、環境経路で暴露される化学物質の慢性影響を評価するため、評価対象となる毒性項目（一般毒性、生殖発生毒性、遺伝毒性、発がん性）を中心に *in silico* 評価手法の活用状況等を調査した。また、急性毒性や感作性等、化審法の対象外となる毒性項目では、*in silico* 評価手法を活用した評価スキームの開発等が進んでいるため、今回の調査ではこれらの毒性項目のための活用状況についても調査対象とした。

## C. 結果及び考察

調査結果の概要を以下に示す。

### C -1. 国内外のリスク評価機関等での *in silico* 評価手法の活用状況

各機関での工業用途の化学物質の有害性評価における活用状況についての状況を示す。

（1）欧州化学品庁（ECHA）

欧州の Registration, Evaluation,

## Authorisation and Restriction of Chemicals

(REACH) 登録においては、特にヒトへの毒性について、可能な限り脊椎動物試験以外の方法 (*in vitro* 法、定性的または定量的構造活性相関 ((Q)SAR) モデル、または構造類似物質からの情報 (グルーピングまたは read-across) を使用することが要求されている。また、近年、規制当局である欧州化学品庁 (ECHA) において、規制ニーズ評価を目的としたグルーピング評価が実施されている。*In silico* 評価手法の活用にあたって、欧州化学品庁 (ECHA) では、QSAR あるいは read across (RA)/グルーピング活用の際の利用条件を REACH 規則附属書 XI 等で規定しており、さらに、考え方や活用する際に留意すべき事項等、評価結果の報告方法についても、ガイダンス等の文書を複数作成し、事業者等に向けて公表している。

ECHA では、REACH 規則第 117 条第 3 項に基づき、3 年毎に動物以外の試験方法及び試験戦略の実施及び使用の状況に関する報告書を欧州委員会に提出することが義務付けられており、2020 年 6 月に公表された報告書”The use of alternatives to testing on animals for the REACH Regulation, Fourth report under Article 117(3) of the REACH Regulation” (ECHA, 2020) では、REACH 登録者が登録のための情報要件を満たすために、試験及び試験以外の手法 (QSAR、read-across/category、weight of evidence、データ省略、試験提案等) をどの程度利用したかを、Annex VII~X の情報要件に該当する 98,017 ドシエを対象とした解析結果が報告されていた。2016 年と 2019 年の活用状況を比較すると、RA/カテゴリーは 27.7% (2016) →25.1% (2019)、QSAR は 3.0% (2016) →2.6% (2019) であり、年数を経たためにこれらの活用が増えた訳ではないことがわかった。なお、実験の実施は、27.6% (2016) →27.1% (2019) であった。

また、毒性項目毎の各種評価法の活用状況についても解析されていた。化審法のた

めの有害性評価項目について確認したところ、一般毒性 (反復投与毒性: 全ての暴露経路) については、RA の活用が最も多く、次に実試験の実施が多かった。生殖発生毒性、*in vivo* 遺伝毒性についても、一般毒性と同様の傾向がみられた。*In vitro* 遺伝毒性は、実試験の実施が最も多く、次いで RA の活用が続いた。発がん性については、RA の活用が比較的多かったが、情報なしで評価できない物質の割合が最も多かった。以上の通り、各毒性項目において RA が活用された評価事例の割合が多いことがわかったが、前述の報告書では、RA の活用事例の多くは法的要件に準拠していないことが多く、化学物質の安全な使用を確保するには不十分であるとしていた。

以上のことから、ECHA では *in silico* 評価手法等の活用を促進するために、様々な文書を作成し評価者をサポートする環境を整えているが、実際の評価では妥当性がある RA を活用した評価結果を得ることは難しい状況があることが伺えた。

なお、REACH 登録における QSAR の活用は、水生環境有害性または生物蓄積性の予測が中心であり、Ames 試験結果を推定する Ames QSAR の発達がみられる *in vitro* 遺伝毒性試験の評価を含め、化審法での毒性評価項目においては、活用率が低いことがわかった。

また、ECHA では、2027 年までに REACH 登録物質や CLP 分類対象物質を含む全ての物質 (2020 年末時点で 23,000 物質) についてリスク管理または新たなデータ生成の優先順位付け (規制措置の優先度が低い物質群の特定も含む) を行うことを目的とした統合規制戦略 (Integrated Regulatory Strategy; IRS) により、データ生成、懸念物質群の特定、規制措置を加速する取り組みを行っている (ECHA, 2021)。この取り組みでは、1 物質毎ではなく構造類似性がある物質をグループ化することにより、リスク管理に向けた作業の効率化 (加速化) や潜在的に懸念がある物質の特定に役立つとし、2021 年

12月に19グループ(454物質)の評価結果を公表している。この取組みの中での化学物質のグループ化は、REACH規則附属書XIに記載されたREACH登録のための比較的厳密なグルーピング方法とは異なり、当局の作業の効率を高め、潜在的な懸念のある物質をグルーピングするための出発点として利用される点に注意が必要である。

以上のことから、グループ化/RAにより有害性評価や化学物質規制に向けた対応の効率化・加速化が可能であるが、どのような目的(場面)でグループ化するのかによって、データの質や類似性の妥当性に求められる精度が決まることがわかった。

## (2) 米国 EPA

The Toxic Substances Control Act (TSCA) では、新規化学物質の上市前届出制度(PMN)において、従来から規制当局である米国環境保護庁(U.S. EPA)によりQSAR/read-acrossを活用した審査が実施されてきた。PMNでは、申請者への具体的な試験要求は行われず、U.S. EPAが開発したカテゴリー及び構造活性相関(SAR)を用いたスクリーニング手法により試験実施が必要なデータの特定を行っている状況である。また、TSCAでは、TSCAにおける脊椎動物試験を削減・改良・代替するための試験法と戦略の開発と実施を促進する戦略プラン(U.S. EPA, 2018)の下、従来の*in silico*評価手法に加え New Approach Methodology (NAM:動物の使用を回避するための化学品の有害性及びリスク評価に関する情報を提供するあらゆる技術、方法論、アプローチ(QSARのようなコンピュータ*in silico*モデルを含む)、またはそれらの組み合わせ)の導入を進めている。NAMの導入に向けた5つの目標(①NAMsに対応するための規制の柔軟性評価、②進捗を評価するためのベースラインと指標の開発、③NAMの科学的信頼性の確立、規制判断への適用の実証、④科学的課題に取り組み、重要な情報ギャップを埋めるためのNAMの開発、⑤ステーク

ホルダーの参画とコミュニケーション)を達成するためのワークプランを2020年の公表し、それを翌年に更新し2024年までの短期的・長期的な戦略を示している。2021年11月のワークプラン更新版(U.S. EPA, 2021b)の中で、NAMの規制上の意思決定への適用性を評価するための6つのケーススタディ候補(いずれも進行中 on-going)を示しており、化審法での人健康評価項目に関連するケーススタディとして、「慢性毒性及び発がん性試験へのNAMsの適用(NAMsの統合による慢性毒性及び非遺伝毒性発がん作用機序の特定と、規制上の決定のための定量的PODの特定)」及び「発達神経毒性(DNT)ポテンシャル評価のためのNAMバッテリーの利用(化学物質のDNTポテンシャルのWeight of Evidence (WoE)評価の目的での神経系の発達において重要な過程を評価する*in vitro*試験バッテリーの取り組み)」があった。

以上のことから、米国での化学物質規制においては、規制当局であるEPAが自ら*In silico*評価手法を活用し、新規物質の審査の効率化を図っていることがわかった。また、*in silico*評価手法以外のNAMは、現在までに化審法における人健康影響評価では着目されていないが、TSCAにおけるケーススタディの結果等に基づき、データギャップを埋める手段としての有用性や必要性を議論する必要が出てくる可能性が示唆された。

## (3) カナダ Environmental Canada and Health Canada

カナダにおける化学物質の評価と管理について規制する最も重要な法律の一つであるカナダ環境保護法(Canadian Environmental Protection Act, CEPA)では、(1)難分解性および/または生物蓄積性があり、ヒトまたは他の生物に対して本質的な毒性を示すか、(2)国民に非常に大きな暴露がある、あるいは暴露の可能性のある物質を特定するために、国内で使用されている約23,000物質をカテゴリゼーションし、2006

年にスクリーニング評価が必要な優先物質として 4300 物質を選定した。優先物質の優先度の内訳は、最優先 500 物質、中程度 2600 物質、低優先 1200 物質としている。カテゴリゼーションの結果に基づき、人や環境に有害な化学物質を規制するための迅速な措置を取るため、化学物質管理計画(Chemicals Management Plan, CMP)の下でリスク評価を進めている。2011 年までに、約 1100 物質について対処した。また、2011 年時点では、その後 5 年間に 9 つのグループに含まれる 500 物質を特定することについても優先事項としていた(<https://canadagazette.gc.ca/rp-pr/pl/2011/2011-10-08/html/notice-avis-eng.html#d127>)。このグルーピングは、CMP の第一段階の一環として行われ、更なる対処とその加速化のために選択されたものである。化学物質の構造的または機能的な類似性に基づいてグループ化され、評価の効率性、管理の効率性、情報に基づいた代替決定を支援する能力、国際的な行動のタイミング及び利害関係者の関与についても考慮しながら設定された方法である(<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/chemical-substances/substance-groupings-initiative.html>)。

なお、PLS のリスク評価の加速化を目指し、CMP への NAM の導入についての検討が進められていたが、様々な方法のレビューの結果、ヒトのばく露推定値と *in vitro* の生物活性に基づく生物活性ばく露比 (bioactivity exposure ratio: BER) をリスク評価における補助的なエビデンスとして用い、リスク評価の優先順位設定に用いることが支持されたものの、確認できた範囲では人健康評価への NAM の取り込みについては言及されていなかった。

本検討では、化学品以外の分野 (医薬品、食品) での *in silico* 評価手法の活用状況についても調査した。国内外における医薬品の不純物、食品中の残留農薬の分解物や代謝物、食品用器具・容器包装からの溶出物、香料の遺伝毒性 (変異原性) の評価

では、すでに *in silico* 評価手法 (QSAR や read across) が活用されており、ガイドラインや評価スキームが提案されている状況である。これらについては、前述の通り、食品安全委員会が作成した報告書「新たな時代に対応した評価技術の検討 ～化学物質の毒性評価のための(Q)SAR 及び Read across の利用～」にまとめられている。食品安全委員会では、*in silico* 評価手法の導入を検討する担当部署及びワーキンググループが設置されており、上記報告書の公表 (2017 年) 以降も、「食品健康影響評価において (Q)SAR を活用して変異原性を評価する場合の手引き (2021 年)」([食品安全委員会評価技術企画ワーキンググループ、2021](https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20031804908&fileId=201)) を作成し、食品用器具及び容器包装からの溶出物質、食品健康影響評価を行う化学物質 (以下「評価対象物質」) の製造過程で生じる不純物、評価対象物質の代謝物等の毒性試験データを得ることが困難な化学物質の毒性評価にあたり、(Q)SAR の予測結果を毒性試験データの代替として活用することを想定し、Ames 試験により検出される突然変異誘発性 (変異原性) を評価する場合の実施手順が定められている。器具・容器包装の溶出物に対してだけでなく、動物用医薬品の評価でも、遺伝毒性に関する情報がない場合は、QSAR を実施し、遺伝毒性 (変異原性) の有無を確認するというスキームができており、QSAR 結果を参照した評価事例も公表されている (オルメトプリム評価書

<https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20031804908&fileId=201>)。

## C-2. 国際機関等による *in silico* 評価手法の開発状況

### (1) OECD

#### 1) Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA)

<https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata/>

IATA は、種々の情報源 (物理化学的特性、*in silico* モデル、グルーピング及び *read-across*、*in vitro* 試験、*in vivo* 試験及びヒトの情報) からのデータを評価・統合し、ハザードまたはリスクの結論を導く手法である。IATA によるケーススタディが実施されており、エンドポイントとして最も多いのは反復投与毒性 (ケーススタディ件数の 34%)、次に発達神経毒性 (17%) であった。化審法での毒性評価項目である生殖発生については 7%、変異原性及び遺伝毒性や発生毒性は各々 3% であり、発がん性に関するケーススタディはなかった。ケーススタディにおける評価の目的としては、グルーピング (*Read across*) が最も多く (50%)、次にスクリーニングや優先順位付け等 (31%) であった。これらのケーススタディによる評価内容を、化審法での人健康影響評価に採用することが可能であるかは、内容の妥当性を客観的に評価する必要があると思われる。また、これらのケーススタディでの *read across* による評価事例については、今後化審法で独自の *read across* 評価を行う場合の、類似物質選定の考え方や、類似性を説明するために必要な項目、評価内容のまとめ方の参考になると考えられる。

## 2) OECD QSAR Toolbox

<https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm>

OECD QSAR Toolbox は、カテゴリーアプローチによる評価を支援するために OECD により開発されたシステムであり、各国から提供された種々の有害性試験データや、化学物質をグルーピングするツールなどが搭載されている (最新バージョンは QSAR Toolbox 4.5)。その他、評価対象物質の類似物質候補の検索にも活用できる。主な機能として、以下が挙げられている。

- ① ターゲット化合物の構造特性及び潜在的なメカニズムまたは作用機序の特定
- ② 同じ構造特性・メカニズムまたは作用機序を有する他の化学物質の特定

## ③ データギャップを埋めるための既存データの利用

今後も毒性データ等の拡充や機能の拡張が予定されていることから、*read across* を行う際の有用なツールになると考えられる。

## (2) 欧米

欧州では、欧州連合 EU による産学協同研究開発プログラム Horizon 2020 により EU-ToxRisk (正式名称: An Integrated European ‘Flagship’ Program Driving Mechanism-based Toxicity Testing and Risk Assessment for the 21st Century) がプロジェクトとして行われた (<https://www.eu-toxrisk.eu/>)。EU-ToxRisk では、反復投与毒性、生殖発生毒性に焦点をあて、NAM を統合した *read-across* ワークフローが開発された。*Read across* は、構造が類似していれば人への有害性も類似しているという仮定を置いて、化学構造及び物理化学的性性状が類似していると考えられる物質の有害性情報を用いてデータギャップの穴埋めを行うが、従来の *read across* では、トキシコキネティクスとトキシコダイナミクスの類似性について説明できている事例が乏しい。そのため、本プロジェクトでは、*in vitro* と *in silico* ツールを用いてトキシコキネティクスとトキシコダイナミクスのデータを獲得することを試みることを提案している。また、ヒト等価用量を予測するための *in vitro* から *in vivo* への外挿が提案されている。生成された NAM データにより、既存の *in vivo* データをサポートし、定性的および/または定量的にヒトへの有害性を予測ができるとしている。本プロジェクトは、*read across* でのデータギャップ穴埋めに NAM データの活用が欠かせないことを示すものであった。本プロジェクトはケーススタディが実施されていたため、今後それらの内容を精査し、どのような場面で具体的にどのような NAM データが活用されているか、またその NAM データはどのような方法で得られたかを確認する必要がある。

一方、米国では、米国環境保護庁 (EPA)、国立環境健康科学研究所 (NIEHS) に本部を置く国家毒性プログラム (NTP)、国立先進トランスレーショナル科学センター (NCATS) 及び食品医薬品局 (FDA) が Toxicology in the 21st Century (Tox21) と呼ばれるコンソーシアムを結成し、市販の化学物質、殺虫剤、食品添加物/汚染物質及び医療製品の安全性を迅速かつ効率的に評価する方法を開発することにより、21 世紀の毒性学の進化を促進することを目指している。Tox21 の目的は、①化学物質により誘発される生物学的活性のメカニズムを特定し、②更なる試験が必要となる物質の優先順位付けを行い、③ *in vivo* 毒性反応をより適切に予測するモデルを開発することとしている。

2021 年 9 月に全米科学アカデミー、工学医学アカデミー主催により“New Approach Methods (NAMs) for Human Health Risk Assessment”と題したワークショップが開催された

(<https://www.nationalacademies.org/event/09-23-2021/new-approach-methods-nams-for-human-health-risk-assessment-meeting-1>)。

この中で、既存の動物試験の変動性とヒトとの関連性に関する文献レビュー結果と、NAM の利用によるバリデーション方法と科学的信頼の確立について報告された。

### C-3. 人健康に関する有害性評価に有用と考えられる毒性データベース

欧米にて様々な毒性データベースが構築されている。ECHA では、OECD による国際統一化学物質情報データベース (International Uniform Chemical Information Database, IUCLID) 形式で整理された有害性情報を公開しており、このうち REACH 登録ドシエの情報、前述の OECD QSARToolbox に統合されており、read-across を行う上で重要な毒性データソースとなっている。米国には、EPA が開発した CompTox Chemicals Dashboard があり、120 万を超える化学物質の化学、毒性、ばく露に関する情

報が収載されている。本データベースは、類似化合物や関連物質リスト (例: PFAS 関連物質リスト)、PubChem などの公開データベース、Generalized Read-across Tool (GenRA) (後述) 等にリンクしており、化学物質の迅速かつ効率的な評価に役立てられることが期待されている。また、EPA は独自で read across ツール、Generalized Read-across Tool (GenRA)を開発した。現時点で GenRA による予測結果の規制目的での利用の情報は得られていないが、今後、EPA による read-across に活用される可能性も考えられる。

以上に示したデータベースやツールは公開されているため、使いやすさや有用性等については、実際に使ってみないと評価できない。今後の本分担研究において Read across 等のケーススタディを行う場合に活用し、その有用性を評価することが可能であると考えられる。また、実際の read across において NAM データの必要性がどの程度あるのかは、まだ実感できていない。そのため、評価対象物質やその類似物質候補に関する既存の有害性情報及び物化性状データの有無や量によるが、今後のケーススタディで NAM データの必要性について検討してみる。

### C-4. *in silico* 評価手法等を活用した最新の評価手法や評価の枠組み等に関する文献調査

Pubmed を用いた文献検索を行った結果、化学物質の人健康影響評価に関連する *in silico* 評価、read-across を含む評価手法開発、評価枠組み、利用状況に関する文献をとして 38 件を抽出した。そのうち、規制当局による read-across の受け入れ状況に関する会合レポート等有用と考えられた文献の概要を整理した。一部の文献をピックアップし、その概要を以下に示す。

1) Chesnut et al. (2018) Regulatory acceptance of read-across. ALTEX. 35(3):413-419.

第 56 回米国毒性学会 (2017 年)にて開催されたサテライトミーティング「規制にお

ける read-across の受け入れ」において、EU、米国、日本の規制当局による read-across の受け入れ状況と規制毒物学における read-across 手法適用の課題と機会について議論した内容の概要 (<https://www.altex.org/index.php/altex/article/view/1005/1134>)が公表されている。この概要によると、read-across は、化学物質の効率的なスクリーニングとデータギャップ補完を可能にする新しいアプローチの 1 つであり、化学物質の安全性評価のための貴重なツールであるとしている。実際に、欧米では香料や食品用器具・容器包装等に使用される物質やその副生成物に関して read across を活用した評価事例があり、各機関が read across を促進するための独自のツールを開発している状況がある。しかし、規制当局が read across を受け入れるためには課題があり、化学構造の類似性が read-across の基礎であるため read-across の結果を裏付け、構造のわずかな違いによる生物学的影響の違いはわずかであることを説明するには、裏付けとなる証拠と試験データによる科学的正当化が必要であることや、ガイダンス文書等を作成することによる標準化や方法の検証、ケーススタディを積み上げることによる規制当局等の関係者のトレーニングが必要であるということが提言されていた。

2) Westmoreland et al. (2022) Use of New Approach Methodologies (NAMs) in regulatory decisions for chemical safety: Report from an EPAA Deep Dive Workshop. Regul Toxicol Pharmacol. 135:105261.

本文献は、動物実験代替アプローチのための欧州パートナーシップ (EPAA) が化学物質の安全性評価における NAM の利用について調査するため 2021 年 11 月に開催された”EPAA Deep Dive Workshop”の概要をまとめた報告書である。このワークショップは、欧州連合の法律下では NAM の広範な使用受け入れが制限されているため、動物実験代替アプローチのための欧州パートナ

シップ (EPAA) は、ヒトの健康を保護することを意図しつつ、規制上の決定を支援することを目的とした、化学安全性評価における NAM の使用を探求するために開催された。議論では、EU REACH 規則、CLP 規則 (規則 (EC) No 1272/2008) および EU Chemicals Strategy for Sustainability (CSS) など化学物質の安全性に関する規制上の決定のための NAM の活用という実際的な問題に焦点を当てていた。

リスク評価における NAMs 利用の代表的な例 (ケーススタディ) では、NAM 適用に関連する論点や主な知見を明確にすることができ、ケーススタディの実施により、化学物質の安全性評価を支援し、評価可能な物質数と評価内容の信頼性を高めることができるとしている。ケーススタディからわかるように、NAM に基づく次世代リスク評価 (NGRA) 方法論は、特定の分野 (例:化粧品による全身毒性と皮膚感作性) における業界内の意思決定にすでに使用されている。また、EC の JRC による調査 (目的: CSS のアクションの一つとして、REACH 情報要件を増加させるためのオプションを開発するのに役立つ可能性のある情報を収集すること) によると、NAM は産業部門で最も利用されており、人健康については、急性全身毒性、特定臓器毒性、変異原性の評価に最も多く NAM が活用されていることが報告された。一方、発がん性、免疫毒性、発達神経毒性、呼吸器感作などのより複雑な機序で生じるエンドポイントでは活用されていないことがわかった。これらのエンドポイントについては、可能な限り早期の NAM の活用を奨励することをより重視すべきであるという合意もあった。また、本ワークショップでは、人健康のための化学物質安全性評価における規制上の決定を支援するための NAM の適用を支える技術とアプローチの科学的進歩を認識する一方で、方法が堅牢で再現可能であることが不可欠であることを確認した。さらに、NAM を活用した規制に関する決定には、適切な方法論が整



備されるだけでなく、規制側がその評価内容を受け入れる体制や経験の積み上げも必要であるとしていた。

#### D. まとめ

本分担研究では、化審法での *in silico* 評価手法の具体的な活用法を提案するための国内外での活用状況等に関する調査を行った。その結果、(Q)SAR については、Ames 試験の結果を推定する場面以外は、国内外で活用が進んでいない状況であることから、化審法においても、現在(新規化学物質や既存物質のスクリーニング評価における遺伝毒性評価の参考情報として扱う)よりも Ames (Q)SAR が活用できる場面を拡大することが可能かを検討することが現実的であると考えた。現時点で Ames (Q)SAR を活用できる可能性がある場面として考えられるのは、既存物質(一般化学物質)のスクリーニング評価の結果、信頼性がある有害性情報が得られず評価できない「情報なし物質」を評価可能とするための取組みである。具体的には、以下の通り：

① 実試験(以下、既存点検という)を実施する候補物質を選定する際の条件の一つとする。

情報なし物質を対象に Ames (Q)SAR を実施し、その結果が陽性であればそれを参照しながら、その他の条件(当該年度の暴露クラスや新たな既評価結果の有無等)を踏まえて、既存点検の候補物質を選定する。

② 既存点検で Ames 試験を実施する必要性を検討する。

信頼性が高いと考えられる Ames (Q)SAR 結果が得られた場合は、Ames 試験の実施は不要と判断し、(Q)SAR による推定結果を採用してスクリーニング評価する。信頼性が乏しい推定結果であった場合は、Ames 試験実施の候補物質として挙げる。

③ Ames 試験のみ有害性情報が無い物質の評価に採用する。

実際にはこの条件に当てはまる物質は少ないが、Ames 試験の結果のみがないため

にスクリーニング評価できない物質があった場合に、Ames (Q)SAR の推定結果の信頼性評価を行った上で採用し、評価を進める。  
④ 有害性情報の取りこぼしがないか最終確認する(データベースとしての活用)。

(Q)SAR モデルの一部は、既存の毒性試験の結果を根拠に判定を出す場合があり、そのようなケースでは、モデルが参照した有害性情報の詳細をレポートとして提供する。スクリーニング評価では、事前に信頼性がある情報源から有害性情報を収集するが、評価に必要な情報の取りこぼしがないかを確認するために、Ames (Q)SAR モデルから出される結果及びその根拠となった実試験情報を活用し、評価を進める。

以上については、どのような物質に対しても適用できるものではない。(Q)SAR 解析を適用できない金属、混合物や重合物等は対象外となる。また、②、③の場合、Ames (Q)SAR の推定結果をそのまま採用するための「推定結果の信頼性を判断する条件」をあらかじめ設定しなければならない。また、Ames (Q)SAR を採用した評価案を専門家(委員)にレビューしてもらう際には、レビューするための Ames (Q)SAR の結果の報告の仕方(様式)を決めることや、推定結果採用の妥当性を判断する基準(前述の「推定結果の信頼性を判断する条件」にも関連)を示すことが求められる。

Read across 及びグルーピングについては、海外では活発にケーススタディの実施やその共有による課題の洗い出しとそれに基づく対処法の検討が精力的に行われている状況を確認できた。また、read across 及びグルーピングは、理論的には化審法での評価項目となっている一般毒性、生殖発生毒性、遺伝毒性、発がん性に適用できると考えられた。しかし、前述の通り、類似性等を含め妥当性がある評価結果を得ることができる事例が少ない状況から考えると、容易に適用できる方法ではないと思われる。実際、化審法のスクリーニング評価においては、OECD 等信頼性が高い情報源の評価書において

## 別添 4

Read across 及びグルーピングを行った評価結果がある場合は、その情報を評価に採用できているが、独自に Read across 及びグルーピングを試みたいいくつかの事例については、海外での状況と同様に、類似物質の妥当性が乏しいと判断され評価保留となった。

Read across 及びグルーピングは、条件（化学構造や物化性状、代謝、毒性プロファイル等について有用な情報があり、target 物質と source 物質が「類似」であることを説明できる科学的根拠を示すことができる）が整った物質にしか適用できない。したがって、本分担研究では、化審法のスクリーニング評価対象物質の中からケーススタディを実施し、類似物質候補の検索方法、化学構造や物化性状、代謝、毒性プロファイル等に関する情報収集の方法や、スクリーニング評価資料における情報の示し方、類似性や Read across/グルーピングの妥当性に関する説明方法について、スクリーニング評価での活用を前提とした検討を進めていく必要があると考えた。

### E. 研究発表

#### E-1. 論文発表

特になし

#### E-2. 学会発表

特になし

### F. 知的所有権の取得状況

#### F-1. 特許取得

該当なし

#### F-2. 実用新案登録

該当なし

#### F-3. その他

該当なし

### G. 引用文献

特になし

令和4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に関する研究

研究分担者 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部

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**

本研究班では発がん性の定量評価に適用可能な新たな遺伝毒性評価法の開発を目的としており、まずは *in vivo* 遺伝毒性試験情報の定量的指標と発がん性の定量的評価指標としての POD (Point of Departure) との相関性を調べた。今年度はその予備的な検討として、既存の *in vivo* 遺伝毒性試験データと同じ試験対象物質の発がん性の定量指標である TD<sub>50</sub> 値との相関性を調べた。その結果、NTP 試験として行われた *in vivo* 小核試験のデータから得られ小核誘発率と TD<sub>50</sub> 値との解析では、良好な相関関係が得られることが示された。両方の試験のベンチマークドースの比較は報告されているが、TD<sub>50</sub> 値と *in vivo* 小核試験の投与用量あたりの小核誘発率との間でも良好な相関関係が示され、解析例数は少ないながらも 30 程度の追加不確実係数を適用すれば、予防的な TD<sub>50</sub> 値を設定できる可能性が示された。また、本年度はトランジェニック遺伝毒性試験の突然変異頻度 (MF) と TD<sub>50</sub> 値の相関性解析も試行的に行った。全体的に *in vivo* 小核試験における解析結果よりも相関性は良好であったが、検索で得られた論文の曝露手法が統一されていないことから、今後 TD<sub>50</sub> 値と比較するための最適な指標の検討が必要になることが示された。しかし、曝露条件の不均一性にもかかわらず良好な相関性が得られたことは、*in vivo* 試験系による突然変異頻度に関する指標を用いた発がん性の定量評価手法の方が、*in vivo* 小核試験よりも精度の高い評価手法を開発できる可能性を示したと考えられる。

**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ているが、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現状から、実質的に多くの優先評価化学物質についての定量的評価を行うことができない。暫定的に、毒性学的懸念の閾値 (TTC) 値を適用するなど暫定的な方法で、曝露量とのマージンに従って優先順位付けを行う事ができて、次の評

価ステップである評価 II 段階で必要とされる精緻な発がん性定量的評価ができない。また、定量的な発がんデータを得るために、多くの優先化学物質に発がん性試験を新たに実施することも現実的な選択枝ではない。そのため、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、本分担研究では、まずは既存の *in vivo* 遺伝毒性試験データと発がん性試験結果の用量相関性の比較を行い、発がん性の定量評価の確立に資する遺伝毒性指標の模索を行うことを目的とした。

**B. 研究方法**

**B-1. 既存の定量的な *in vivo* 遺伝毒性試験**

### データの検索

まず、発がん性の定量的データとの比較が可能となる既存の *in vivo* 遺伝毒性試験データを収集するために、発がんの定量的情報が包括的に収集されている Goldら CPDB に掲載されている化学物質について、*in vivo* 遺伝毒性試験の報告されている文献収集を行った。

TD<sub>50</sub> が推定されている化学物質のリストは、U.S. National Library Medicine の CPDB のサイトより得た。物質検索としては、リスト上には 1547 物質が掲載されているが、CAS 番号の無い混合物質は CAS 番号なしで検索し、CAS 番号は同じであるが物質グレードが異なるものについては、グレードなどの情報を除いて検索を行うこととした。最終的に検索対象化学物質数は 1530 となった。一方、*in vivo* 遺伝毒性試験データが掲載されている論文を検索するためには、その後に纏まった物質数の解析を行う必要があるため、*in vivo* 遺伝毒性試験データが得られやすい試験法を検索対象とすることとした。この観点において、すでに *in vivo* 小核試験の小核誘発率の BMDL 値と NTP の発がん性試験における発がん性頻度の BMDL とを比較した先行研究 (Soeteman-Hernández ら, 2016) が知られているので、文献検索においても *in vivo* 小核試験を検索対象の遺伝毒性試験とした。また、本研究班の他の分担研究では、トランジェニック動物を使った変異原性試験の定量データや次世代シーケンサーを用いた変異頻度を検出する系との比較も検討していることから、トランスジェニックマウスを用いた試験を報告した論文の検索も行った。

文献検索は Pubmed 対して以下の検索式を使い、1530 物質について自動検索プログラムを使って検索した。

「*in vivo* 小核試験」を含む検索式:

("CPDB 記載物質名"[all] OR CAS#[RN]) AND (genotoxicity[all] AND "*in vivo*"[all] AND "micronucleus test"[all])

「トランスジェニックマウス」を含む検索式:

("CPDB 記載物質名"[all] OR CAS# [RN]) AND genotoxicity[all] AND ("lambda transgenic"[all] OR "lacZ transgenic"[all] OR

"Muta Mouse"[all] OR "Big Blue"[all] OR "MutaMouse"[all] OR "BigBlue"[all])

### B-2. モデルの検証

データギャップ検証のため、Lhasa 研究所の DART AOP ネットワークに対して類似検索方法を行うとともに Derek Nexus の性能も検証した。

### B-3. データ解析

検索で得られた論文の原著を入手し、Table 等に記載されている小核の誘発率、あるいは変異誘発率 (Mutation Frequency) のデータと共に、実験動物の処理条件 (投与量や頻度、投与期間など) を入手し、曝露量あたりの定量的な遺伝毒性データを入手した。一方 TD<sub>50</sub> 値については、Lhasa 社の CPDB データベースより検索できた化学物質の SummaryTD<sub>50</sub> 値あるいは、投与群が 2 用量以上の動物実験から得られた TD<sub>50</sub> の最小値 (最小 TD<sub>50</sub> 値) を入手し、上記の遺伝毒性毒性の定量データと比較した。

## C. 研究結果

### C-1. *in vivo* 小核誘発能と TD<sub>50</sub> 値の相関性解析

検索でヒットした論文は、525 件で、*in vivo* 遺伝毒性試験で陽性対照として使用される 4 物質 (Cyclophosphamide、Benzo(a)pyrene、Mitomycin-c、Methyl methanesulfonate は 2 用量以上の定量性を評価できるデータが含まれない可能性が高いので、対象外物質としたところ、対象論文は重複論文を除いて 239 報となった。これらの論文の要旨を確認して、定量性を示す複数用量の試験結果の内容が含まれる 37 文献を選定した。しかし、実際に原著を検証したところ、CPDB に TD<sub>50</sub> のデータが掲載された物質のうち 10 報 (11 物質) についての定量的な *in vivo* 小核試験データしか得られなかった。各物質について mg/kg 投与あたりもとも小核誘発率の高かったデータと最小 TD<sub>50</sub> 値との相関性を図 1 に示したが、全く相関性は認められなかった。また、物質の中には、TD<sub>50</sub> は

別添 4

計算されてはいるが発がん性試験で陰性結果となっているものも含まれていたため、それらを

除いた 8 物質について解析してみたが、状況はほとんど変わらなかった(図 2)。

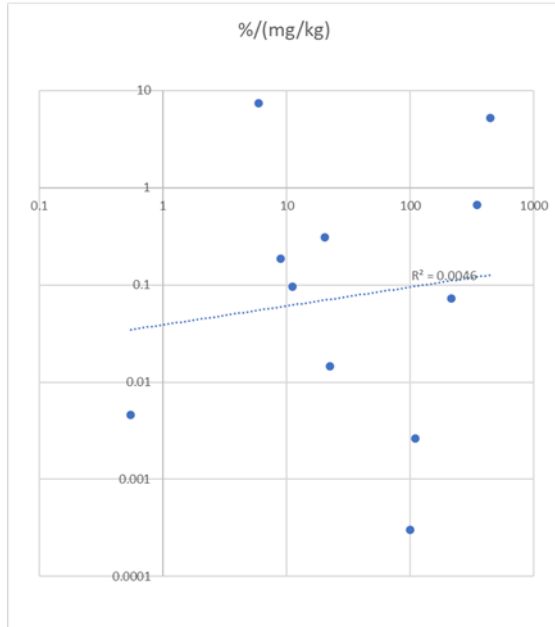


図1 最小 TD<sub>50</sub> 値と mg/kg あたりの小核誘発%の相関性

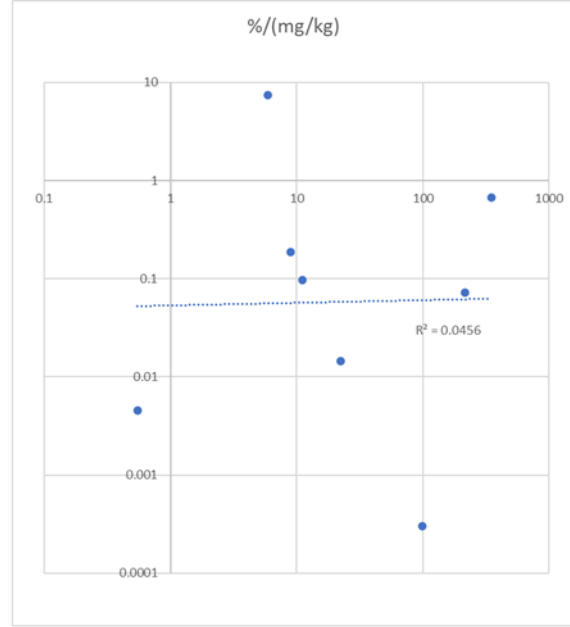


図2 最小 TD<sub>50</sub> 値と mg/kg あたりの小核誘発%の相関性  
(発がん陰性物質を除く)

そこで、文献検索では十分なデータセットを抽出できなかったため、先行研究で報告されている *in vivo* 小核試験データ (BMDL 値) と TD<sub>50</sub> との比較を検証した。Soeteman-Hernández ら(2016)の論文でデータ解析されている 54 物質のうち、Lhasa 社のデータベースからマウスの TD<sub>50</sub> 値が得られた 21 物質について、最小の TD<sub>50</sub> 値と mg/kg 投与あたりの小核誘発率の相関性を図 3 に示した。mg/kg 投与あたりの小核誘発率は、論文において算出されていた BMDL<sub>5</sub> 値を 5% の小

核誘発率と仮定して、投与用量で除することで算出した。その結果、両対数グラフでの決定係数 (R<sup>2</sup>) が 0.26 程度の相関性が示すことができた。また、予測式 (点線) の土約 5 倍の 2 直線 (実線) の内側に多くの点が局在していることも示された (図 3)。横軸を最小の TD<sub>50</sub> の代わりに、Lhasa 研究所の CPDB の SummaryTD<sub>50</sub> 値 (■) や発がん性の BMDL<sub>10</sub> 値の 5 倍値 (▲) と比較すると R<sup>2</sup> は約 0.5 以上と相関性が高くなることが示された (図 4)。

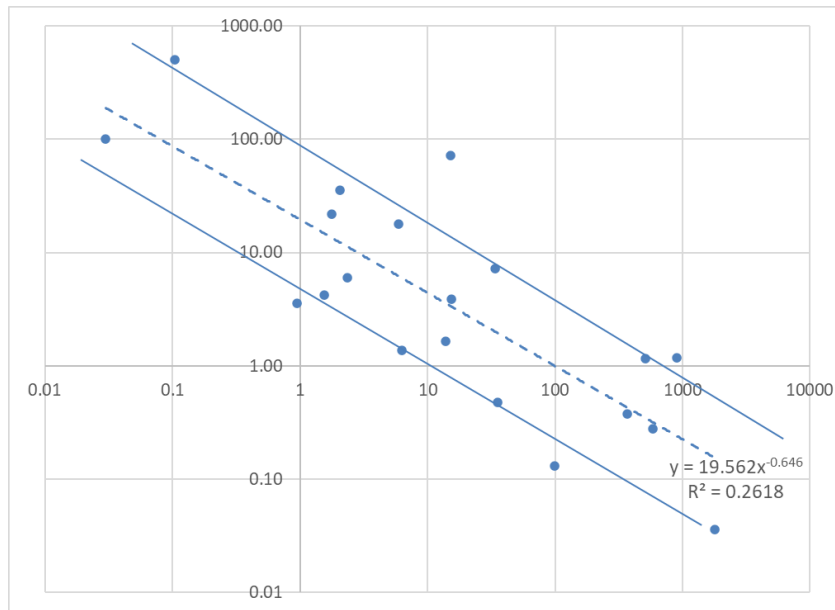


図 3 最小 TD<sub>50</sub> 値と mg/kg あたりの小核誘発%の相関性 (Soeteman-Hernández ら (2016) の論文データ解析)

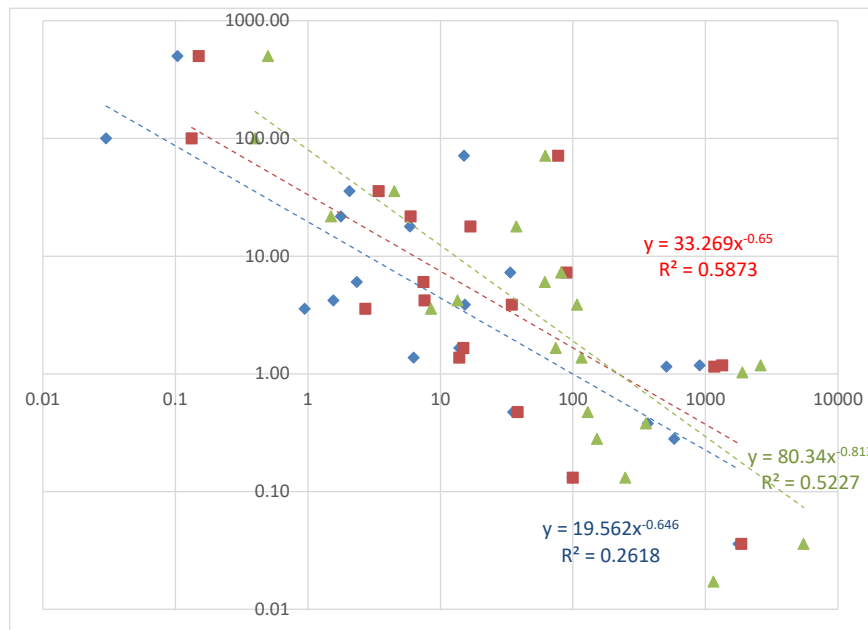


図 4 最小 TD<sub>50</sub> 値(◆)、SummaryTD<sub>50</sub> 値(■)、5xBMDL<sub>10</sub>(▲)と mg/kg あたりの小核誘発%の相関性

C-2. トランジェニック遺伝毒性試験の突然変異頻度(MF)と TD<sub>50</sub> 値の相関性解析

「トランスジェニックマウス」を含む検索式によって得られた 166 報のうち 35 物質についての文献 67 報から重複した論文を除いた 55 報について、要旨から定量性に関する記載がある 17 報について原著を確認し、突然変異頻度に関するデータの抽出を行っ

た。そのうち 14 報から 26 レコードを取り出すことができたが、同じ物質について複数のデータがあり、各物質について投与用量あたりの MF 増加率が最も高い値を選定することにより、12 物質に関する MF 増加率を解析に用いた。TD<sub>50</sub> 値としては最小の TD<sub>50</sub> 値(●)と SummaryTD<sub>50</sub> 値(●)を比較対象とした。図5は、1動物に投与した全投与 mg

別添 4

あたりの対照群に対して投与群で増加した MF の増加率 (fold change/mg total) と TD<sub>50</sub> 値の相関関係を示した。図6は、体重あたりの全投与用量に対する MF 増加倍率 (fold change/(mg/kg)) を、図7は、1日あたりの投与用量に対する MF 増加率 (fold

change/(mg/kg/day)) を縦軸の指標として解析した。その結果、体重あたりの全投与用量に対する MF 増加率と最小の TD<sub>50</sub> 値の間で高い相関性 (R<sup>2</sup>=0.88) が得られた (図6)。

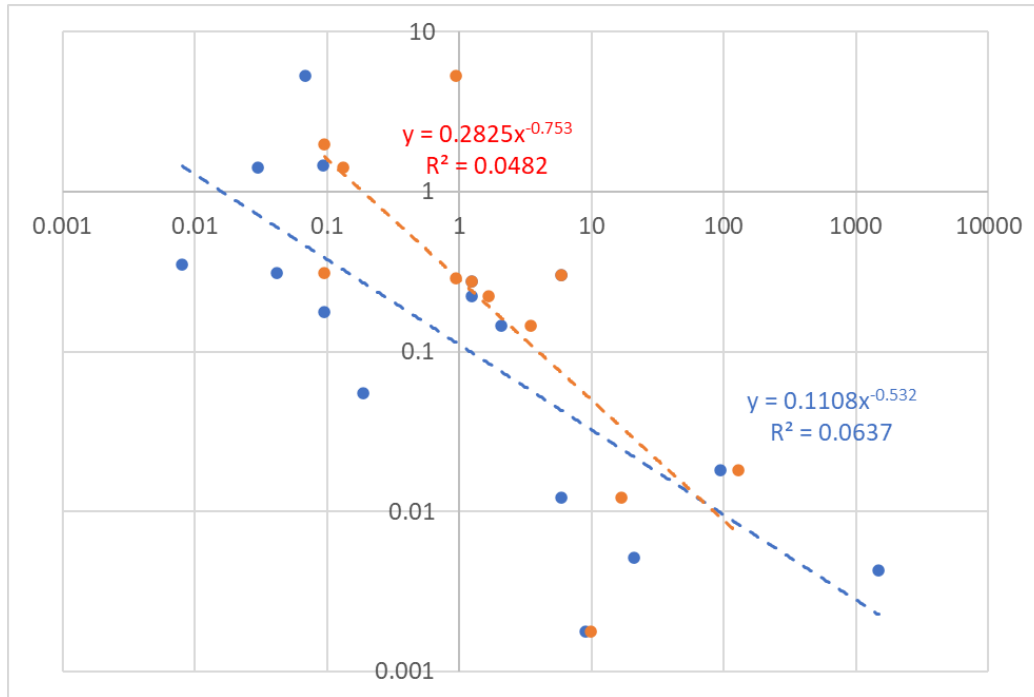


図5 1動物に投与した全投与 mg あたり MF 増加倍率と TD<sub>50</sub> の相関性

別添 4

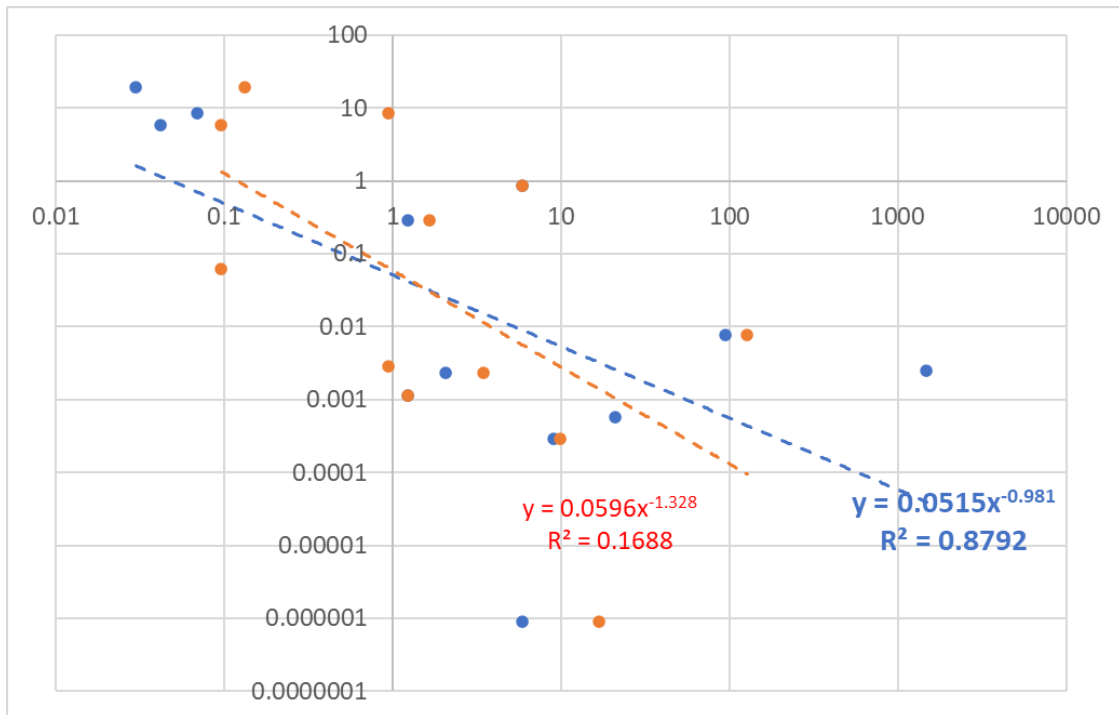


図5 体重 1kg あたりの MF 増加率と TD<sub>50</sub> の相関性

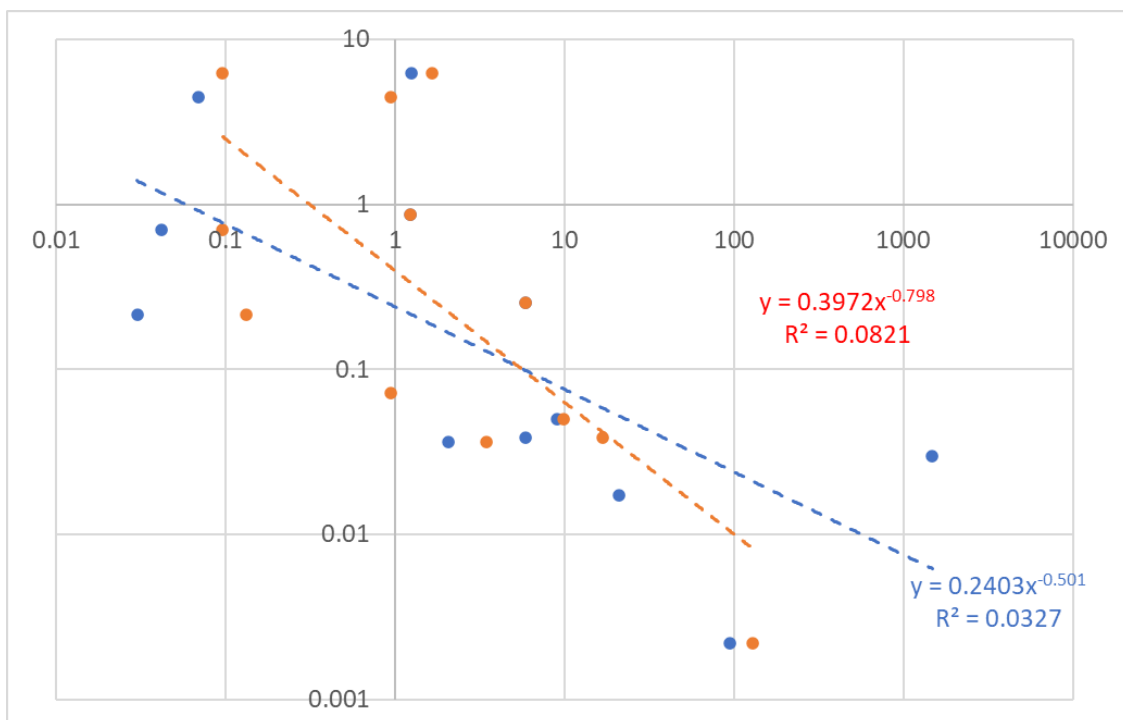


図5 1日あたり、体重 1kg あたりの MF 増加率と TD<sub>50</sub> の相関性



#### D. 考察

本研究班では発がん性の定量評価に適用可能な *in vivo* 遺伝毒性試験結果からの POD (Point of Departure) の設定を目的としており、本年度は、その予備的な検討として、既存の *in vivo* 遺伝毒性の指標と発がん性の定量評価指標である TD<sub>50</sub> との相関性を調べた。すでに Soeteman-Hernández ら (2016) により、*in vivo* 小核試験の小核誘発率と発がん性試験の発がん誘発率のそれぞれベンチマークドースの相関性を比較した研究がなされているが、ベンチマークドース法より広範な発がん性試験データにて起用可能な TD<sub>50</sub> 値を用いた相関解析を試みて、*in vivo* 遺伝毒性試験の定量データの TD<sub>50</sub> 予測可能性についての予備検討を行った。残念ながら、TD<sub>50</sub> 値が設定されている物質の中から定量的な *in vivo* 小核試験データを報告した論文の自動文献検索は上手く機能せず、十分な解析データ数は得られなかったが、NTP 試験の中で行われた *in vivo* 小核試験のデータと TD<sub>50</sub> の解析では、良好な相関関係が得られることが示された。当初、より感受性の高い指標として CPDB データベースのうち最小の TD<sub>50</sub> 値を用いて相関性を検討したが、相関係数の二乗値である決定係数 (R<sup>2</sup>) を比較する限りにおいては、CPDB で調和平均を基に算出されている SummaryTD<sub>50</sub> 値の相関性のほうが高いという結果が示された。ただし、図 3 に示された予測式からの各点の見た目のバラツキは、最小の TD<sub>50</sub> 値の方が予測式近くに収束しているように見え、さらなるデータの追加で検証が必要であると考えられた。また、図 2 で示すように予測式から得られる *in vivo* 小核誘発率からの TD<sub>50</sub> 予測直線から 5 倍程度以内の直線の中に多くの点が入るということは、*in vivo* 小核誘発率からこの予測式をもとに予測した TD<sub>50</sub> 値に不確実係数として 30 程度で除しておけば、多くの TD<sub>50</sub> 値がそれ以上となるという定量的評価値として使うことができる可能性を示している。これは、TD<sub>50</sub> を正確に予測する評価手法では無く、*in vivo* 遺伝毒性試験結果で予測された TD<sub>50</sub> 値を半定量的に安全サイドの評価値として行政判断に使える

可能性を示している。

また、本年度はトランジェニック遺伝毒性試験の突然変異頻度 (MF) と TD<sub>50</sub> 値の相関性解析も試行的に行った。全体的に R<sup>2</sup> 値は *in vivo* 遺伝毒性試験結果で得られた解析結果より相関性が良好であった。この解析では、SummaryTD<sub>50</sub> 値より最小の TD<sub>50</sub> 値の方が相関性が高かった。一方、投与用量あたりの突然変異頻度の表現方法は 3 通り行っており、今回の解析では図 6 に示すように体重あたりの全投与用量に対する MF 増加倍率 (fold change/ (mg/kg)) に対する相関性が最も高かった。しかし、文献検索した論文のトランジェニック遺伝毒性試験の曝露条件は、単回投与から慢性投与までバラエティに富んでおり、*in vivo* 小核試験のように試験法が統一されていないので、どの指標が最適であるについては、さらなるデータの集積や試験条件の統一化等も必要になってくると考えられた。しかし、曝露条件の不均一性にもかかわらず、良好な相関性が得られたことは、*in vivo* 試験系による突然変異頻度に関する指標を用いた発がん性の定量評価手法の方が、*in vivo* 小核試験よりも精度の高い評価手法が開発できる可能性を示したと考えられる。

#### E. 結論

本研究班では発がん性の定量評価に適用可能な新たな遺伝毒性評価法の開発を目的としており、まずは *in vivo* 遺伝毒性試験情報の定量的指標と発がん性の定量的評価指標としての POD (Point of Departure) との相関性を調べた。今年度はその予備的な検討として、既存の *in vivo* 遺伝毒性試験データと同じ試験対象物質の発がん性の定量指標である TD<sub>50</sub> 値との相関性を調べた。その結果、NTP 試験として行われた *in vivo* 小核試験のデータから得られ小核誘発率と TD<sub>50</sub> 値との解析では、良好な相関関係が得られることが示された。両方の試験のベンチマークドースの比較は報告されているが、TD<sub>50</sub> 値と *in vivo* 小核試験の投与用量あたりの小核誘発率との間でも良好な相関関係が示され、解析例数は少ないながらも 30 程度

## 別添 4

の追加不確実係数を適用すれば、予防的な TD<sub>50</sub> 値を設定できる可能性が示された。また、本年度はトランジェニック遺伝毒性試験の突然変異頻度(MF)と TD<sub>50</sub> 値の相関性解析も試行的に行った。全体的に *in vivo* 小核試験における解析結果よりも相関性は良好であったが、検索で得られた論文の曝露手法が統一されていないことから、TD<sub>50</sub> 値と比較するための最適な指標の検討が今後、必要になることが示された。しかし、曝露条件の不均一性にもかかわらず、良好な相関性が得られたことは、*in vivo* 試験系による突然変異頻度に関する指標を用いた発がん性の定量評価手法の方が、*in vivo* 小核試験よりも精度の高い評価手法を開発できる可能性を示したと考えられる。

### F. 研究発表

#### F-1. 論文発表

特になし

#### F-2. 学会発表

1. Matsumoto M, Murata Y, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Umano T, Hirose A: Derivation of a target value of 1,3-butadiene, a possible contaminant, in drinking water, ICT2022, (2022.9.18-21, Maastricht)

### G. 知的所有権の出願・登録状況

#### 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. 参考文献

Soeteman-Hernández LG, Johnson GE, Slob W. Estimating the carcinogenic potency of chemicals from the *in vivo* micronucleus test. *Mutagenesis*. 2016 May;31(3):347-58.

令和4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* 遺伝毒性と発がん性の量的相関性を検討するため、肝発がん物質を用いたトランスジェニック動物遺伝子突然変異試験（TGR 試験）の用量反応データから変異原性の point of departure (POD) を算出した。ベンチマークドーズ (BMD) 法における critical effect size (CES)（背景値からの一定の反応の程度）は 0.5（陰性対照値と比べて 50% 増加）を用いた。発がん性 POD として carcinogenic potency database (CPDB) の発がん試験情報から TD<sub>50</sub> および BMDL<sub>10</sub> を用いた。肝臓における変異原性 POD (BMDL<sub>50</sub>) と発がん性 POD (TD<sub>50</sub> または BMDL<sub>10</sub>) は概ね正の相関性を示した。変異原性 BMDL<sub>50</sub> の値を係数 10~100 で除すると TD<sub>50</sub> を下回った。試験データによって発がん性 POD のばらつきが大きく、量的評価における不確実性要因のひとつと考えられた。遺伝毒性分野の国際会議である IWGT において、*in vivo* 遺伝毒性試験の用量反応データを BMD 法で解析する場合の CES 値として 0.5 を用いることが提案された。遺伝毒性試験の用量反応データから BMD 法を用いて量的評価指標を導出することの有用性が示唆された。

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

**A. 研究目的**

化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）における優先評価化学物質のリスク評価（一次）では、評価の優先順位付けを行う評価I段階から、発がん性情報を得られた物質については遺伝毒性の定性的評価結果に基づき判断した閾値の有無に応じて、発がん性の有害性評価値を導出することされる。しかし、遺伝毒性試験の情報などから閾値なしと判断され発がん性の懸念があるにもかかわらず、発がん性の定量的評価に資する発がん性試験結果の情報がない優先評価化学物質については、発がん性の定量的評価を行うことができない。そのため、優先評価化学物質に指定された閾値なし発がん性の懸念を有する物質が評価II段階に停滞しないよう、多数の動物や時間・費用を要する発がん試験に代わる、新たな

発がん性定量的評価手法の開発と確立が求められている。本研究においては、遺伝毒性を有する化学物質の発がん性の定量的評価に応用可能な遺伝毒性評価法の開発を目指す。本分担研究においては、*in vivo* 遺伝毒性試験結果から遺伝毒性 POD（Point of Departure）の設定を行ない、発がん性 POD との相関性から量的評価指標の導出が可能か検討する。

**B. 研究方法**

トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験（TGR試験）と発がん性の相関性を検討するため、遺伝毒性 POD と発がん性 POD の量的相関から遺伝毒性発がん物質の定量的評価指標の導出を試みた。過去に実施した肝発がん物質の TGR 試験データを用いて、変異原性 POD を求め、発がん性 POD と比較

した。具体的には、*N*-nitrosodimethylamine (NDMA)、*N*-nitrosodiethylamine (NDEA)、2-acetylaminofluorene (2-AAF)、2,4-diaminotoluene (2,4-DAT)をMutaマウスに28日間経口投与し3日後に組織採取して実施したTGR試験 (*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た。変異原性PODの算出にはベンチマークドーズ (BMD) 法を用いた (使用ソフト: PROAST web)。モデル選択として平均化モデル (model averaging) を採用した。計算の際、陰性対照値からの増加の程度を示すパラメータであるbenchmark response (BMR) またはcritical effect size (CES) として0.1 (陰性対照値と比べて10%増加) と0.5 (50%増加) を設定した。変異原性PODとしてBMDL<sub>50</sub>を算出した。発がん性データはcarcinogenic potency database (CPDB)から入手した。マウスおよびラットの経口試験に絞って発がん試験の情報を収集し、肝発がんのPODとしてTD<sub>50</sub>およびBMDL<sub>10</sub>を算出した。また、2022年8~9月にオタワで開催されたInternational Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT) および International Conference on Environmental Mutagens (ICEM)に参加し、遺伝毒性の定量的分析とリスク評価に関する情報収集を行った。

(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

肝発がん物質を経口投与したマウスの肝臓で実施したTGR試験における遺伝子突然変異体頻度の用量反応データから変異原性PODを算出した。BMD法によって算出したBMD<sub>50</sub>の信頼区間 (BMDL-BMDU) は、NDMAは0.072-0.31 mg/kg/day、NDEAは0.173-0.528 mg/kg/day、2-AAFは17-44.1 mg/kg/day、2,4-DATは35.3-68.7 mg/kg/dayであった。また、各試験において有意な変異体頻度の増加が認められなかった最大用量

(no observed genotoxic effect level: NOGEL) は、NDMAは0.1 mg/kg/day、NDEAは0.156 mg/kg/day、2-AAFは30 mg/kg/day、2,4-DATは40 mg/kg/dayであった。BMDL<sub>50</sub>とNOGELの値はほぼ等しかった (2倍以内の差)。発がん性PODについては、CPDBのデータを用いて3通りの方法で算出した。第1は、BMD解析に適切と考えられる、十分な投与期間と複数の用量群を持つ用量反応データを1つ選択し、BMDL<sub>10</sub>を算出した。第2は、第1と同じデータのTD<sub>50</sub>を採用した。第3は、物質ごとにCPDBに記載された複数のTD<sub>50</sub>値 (肝臓を対象) の平均値を求めた。なお、2,4-DATではBMDL<sub>10</sub>が極端な低値となったため採用しなかった。発がん性PODの結果は表にまとめた (表1)。今回用いた肝発がん物質4種について、変異原性POD (BMDL<sub>50</sub>) と発がん性POD (TD<sub>50</sub>またはBMDL<sub>10</sub>) は、標的組織において概ね正の相関性を示した (図1 A,B)。加えて、変異原性BMDL<sub>50</sub> (mg/kg/day) を係数10~100で除するとTD<sub>50</sub>値を下回る傾向が見られた。一方、CPDBには複数の発がん試験から得られた異なるTD<sub>50</sub>が記載されており、その値には数10倍~数100倍のばらつきが認められた (表1)。そこで、複数のTD<sub>50</sub>の平均値 (とその範囲) を発がん性PODとして変異原性BMDL<sub>50</sub>と比較した (図1 C)。その結果、CPDBに掲載されたTD<sub>50</sub>値には大きなばらつきがあるものの、変異原性BMDL<sub>50</sub>を係数100で除するとTD<sub>50</sub>の下限を下回った。

2022年8月~9月に開催されたICEM及びサテライト会議であるIWGTにおいて、遺伝毒性の量的評価に関する議論が行われた。遺伝毒性の用量反応データとPODの分析にBMD法を用いることが適当とのコンセンサスが得られた。BMD法においてCES (BMR) の設定は重要であり、CESの設定には遺伝毒性試験のデータの特徴を考慮する必要がある。遺伝毒性CESは、陰性対照値に対する平均変化率 (%) として定義することが推奨されるとされた。*In vivo*試験データの解析に用いるCESの値としては0.5が支持された (小

核試験、コメント試験、*Pig-a*試験、TGR試験)。一方で、*in vitro*遺伝毒性試験データから求めたPODを定量的リスク評価に使用するためには、さらなるケーススタディと標準化の努力が必要とされた。また、遺伝毒性の量的評価に関して、一定の用量以下ではヒトに対するリスクは無視できるとするHealth based Guidance Value (HBGV)の考え方について議論された。

#### D. 考察

肝発がん物質を用いて肝臓における変異原性PODと発がん性PODの相関性を検討した。NDMAとNDEAを強い発がん性物質、2-AAFと2,4-DATを中程度の発がん物質とすると、変異原性PODと発がん性PODには正の相関がみられた。変異原性PODにはBMDL<sub>50</sub>を用いた。十分に間隔が狭い用量設定で実施されたTGR試験において、BMDL<sub>50</sub>値はNOGELと近い値になることが示唆された。これは変異原性PODとしてBMDL<sub>50</sub>を用いることの妥当性を支持するものとする。一方、発がん性PODとしてはTD<sub>50</sub>やBMDL<sub>10</sub>が広く用いられている。今回2,4-DATでBMDL<sub>10</sub>が極端な低値となったように、BMD解析は元となる用量反応データの質によって算出値が大きく異なる。従ってBMD解析に適切な試験データを選択することが重要である。用量群が多いこと（できれば3用量以上）、1群の個体数が多いこと、陰性対照背景値が低いことなどが条件となるが、その反面、複数の試験データの中から解析用のデータを選別するため、算出した値をその物質を代表するPODとして使用することの妥当性に懸念もある。幅広いデータからBMDを算出し、最も低いBMDL<sub>10</sub>を採用するなどの工夫が必要と考える。TD<sub>50</sub>についても同様の課題がある。CPDBには、同一物質について異なる発がん試験や異なる発がん標的臓器から算出された複数のTD<sub>50</sub>が掲載されているが、そのTD<sub>50</sub>値には数10倍～数100倍の差がある。*In vivo*遺伝毒性試験と発がん性試験の量的比較を行う際、試験デー

タによってPODが大きく異なり、特に発がん性POD算出時に使用する発がんデータの違い（異なる実験、異なるがん種類）が不確実性の要因となることが示唆された。発がん試験データに限られる場合、適切なデータ選択が難しいことから、精緻な試算より包括的な係数を用いた比較が実際的と考えられた。今回、4種の肝発がん物質の発がん性POD (TD<sub>50</sub>)のばらつきはそれぞれ数10倍～数100倍であったが、変異原性POD (BMDL<sub>50</sub>)に100倍の係数を用いた場合、いずれも発がん性POD (TD<sub>50</sub>)を下回った。定量的分析は、元となる試験データに大きく依存することから、適切なケーススタディが選ばれているかに留意する必要がある。TGR試験のように試験数が少ない場合、ケーススタディに他の選択肢がなく、試験ごとのばらつきをどのように考慮するかが問題となる。BMD法では用量反応データの信頼区間をとるため、試験データのばらつきをある程度考慮したPODを算出することができると考える。今回は発がん標的とTGR試験の標的臓器が同じケースで比較を行ったが、標的臓器が異なる場合にどのような傾向がみられるか、また、他の*in vivo*遺伝毒性エンドポイントを用いた場合に量的相関性にどのように影響するかが今後の検討課題と考える。2022年のIWGT会議において、*in vivo*遺伝毒性試験からBMD法を用いて算出したPODを定量的リスク評価に用いる試みについて議論された。異なる*in vivo*試験（小核試験、コメント試験、*Pig-a*試験、TGR試験）について、BMD解析に用いるCESの値としていずれも0.5を用いることが提案されたことは、実際的な定量的評価に前向きな提案として興味深い。また、遺伝毒性の量的評価に関して、一定の用量以下ではヒトに対するリスクは無視できるとする、health based Guidance Value (HBGV)の考え方が紹介された。HBGVより低用量では、細胞のDNA修復等の防御メカニズムが飽和していないと考えられ、反応と陰性対照値の差は無視できるレベルとされる。HBGVはPOD (BMDL)を不確実係

## 別添 4

数(UF)で除して求められる。UFを構成する因子として、DNA修復能の個人差や遺伝子突然変異の影響の重大性について検討された。HBGV(=BMDL/UFs)のコンセプトはいわゆる閾値ありモデルであり、遺伝毒性発がん物質に閾値が設定できないとする現在のリスク評価の考え方とは異なる。リスク評価における規制サイドの見解と受け入れ可能性は明らかでなく、今後の議論が必要と考えられる。

### E. 結論

*In vivo*遺伝毒性試験(TGR試験)と発がん性試験のPODを算出し、両者を比較した。肝発がん物質の標的臓器において、変異原性PODと発がん性PODに概ね正の相関がみられた。変異原性PODから発がん性PODへの換算を考えた場合、試験データによって発がん性PODのばらつきが大きいことが不確実性の要因のひとつと考えられた。今回、発がん性POD(TD<sub>50</sub>)のばらつきは数10倍~数100倍であり、変異原性POD(BMDL<sub>50</sub>)に100倍の不確実係数を適用すると発がん性PODを下回る結果が得られた。遺伝毒性分野の国際会議であるIWGTにおいて、*in vivo*遺伝毒性試験の用量反応データをBMD法で解析する場合のCES(BMR)の値として0.5(陰性対照値と比べて50%増加)が支持された。また、遺伝毒性の量的評価に関してHBGVの概念が議論された。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### G-1. 論文発表

1. Iso T, Natsume M, Murata Y, Shigeta Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama K, Matsumoto M, Hirose A: Absence of *in vivo* mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfonohydrazide) in liver and glandular stomach of Muta<sup>TM</sup>

Mouse. *Fundamental Toxicol Sci* 2022 9:31-36.

2. Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama K, Masumura K: Genotoxicity assessment of food-flavoring chemicals used in Japan. *Toxicology Reports* 2022 9: 1008-1012.
3. Kawashima A, Inoue K, Ushida K, Kai K, Suzuki H, Matsumoto M, Masumura K, Hirose A: Derivation of human health hazard assessment values for toluene under the Japanese Chemical Substances Control Law. *Fundamental Toxicol Sci* 2022 9:123-133.
4. 杉山圭一, 増村健一: ゲノム不安定性評価を見据えた遺伝毒性研究の新潮流. *日薬理誌* 2022 157: 1-6.

#### G-2. 学会発表

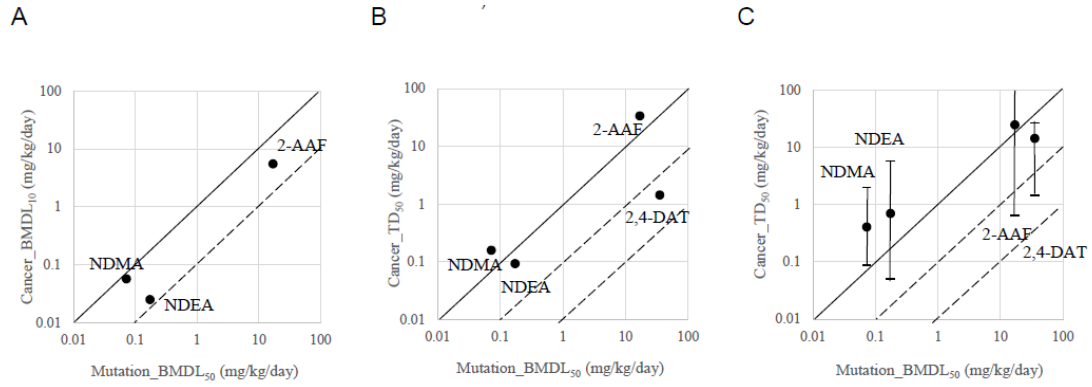
1. 増村健一: HESI GTTC annual meeting 報告. 日本環境変異原ゲノム学会・MMS研究会第80回定例会(2022.06)
2. 村田康允, 磯貴子, 重田義之, 広瀬望, 馬野高昭, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦: トランスジェニックマウスを用いたスチレンの遺伝子突然変異試験. 第49回日本毒性学会学術年会(2021.06)
3. 磯貴子, 村田康允, 重田義之, 広瀬望, 馬野高昭, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦: カルベンダジムの*in vivo*遺伝毒性評価. 第49回日本毒性学会学術年会(2022.06)
4. Masumura K: Mutagenicity in germ cells and *de novo* mutations in the offspring. The 13th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) and the 53rd Annual Meeting of the Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS) (2022.08)
5. Matsumura S, Hirose T, Otsubo Y, Ikeda N, Yamane M, Suzuki T, Masumura K, Sugiyama K: Evaluation of the error-

- |  |  |
|--|--|
| <p>corrected sequencing-based mutagenicity assay using <i>gpt delta</i> mice. The 13th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) and the 53rd Annual Meeting of the Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS) (2022.08)</p> <p>6. <u>増村健一</u>：マウス雄性生殖細胞に誘発された点突然変異と次世代個体の <i>de novo</i> 突然変異の解析. 日本放射線影響学会第65回大会(2022.09)</p> <p>7. <u>増村健一</u>、<u>橋本清弘</u>：8th IWGT 概要報告. 日本環境変異原ゲノム学会・MMS 研究会第81回定例会 (2022.11)</p> <p>8. <u>増村健一</u>、<u>安東朋子</u>、<u>石井雄二</u>、<u>杉山圭一</u>：<i>gpt delta</i> マウスを用いたアクリルアミドの生殖細胞変異原性と次世代個体ゲノム変異の解析. 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会 (2022.11)</p> <p>9. 竹入章, 和田直子, 本山茂記, 田中美咲, 田中健司, 松崎香織, 松尾沙織里, 藤井悦子, 三島雅之, 寺社下浩一, <u>Petr Grúz</u>, <u>増村健一</u>, <u>能美健彦</u>, <u>杉山圭一</u>, 本間正充：DNA polymerase kappa 不活性化マウスにおいて mitomycin C によって誘発される <math>\gamma</math>H2AX の免疫組織学的解析. 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会(2022.11)</p> <p>10. 松村奨士, 細井紗弥佳, 廣瀬貴子, 大坪裕紀, 池田直弘, 山根雅之, <u>鈴木孝昌</u>, <u>増村健一</u>, <u>杉山圭一</u>：Error-corrected sequencing (ECS) の有用性検証 (<i>gpt delta</i> マウスを用いた感度、施設間差の検証). 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会(2022.11)</p> <p>11. Matsumura S, Otsubo Y, Hosoi S, Hirose T, Ikeda N, Yamane M, <u>Suzuki T</u>, <u>Masumura K</u>, <u>Sugiyama K</u>: Current status and expectation on error-corrected NGS technology. 45th Environmental Mutagen Society of India (EMSI) Annual Meeting and International</p> | <p>Conference (2023.01)</p> <p><b>H. 知的財産権の出願・登録状況</b></p> <p><u>H-1. 特許取得</u><br/>該当なし</p> <p><u>H-2. 実用新案登録</u><br/>該当なし</p> <p><u>H-3. その他</u><br/>該当なし</p> |
|--|--|

表 1 : 肝発がん性のPODまとめ

Table. TD <sub>50</sub> and BMD values calculated by carcinogenicity dose-response data.				
(mg/kg/day)	DMN	DEN	2-AAF	2,4-DAT
Liver TD <sub>50</sub> _average	0.405	0.701	24.5	14.2
95%CI data range	0.212~0.602 (0.0867 - 1.95)	0~1.68 (0.0498 - 5.87)	11.3~33.8 (0.64 - 156)	0~28.4 (1.43 - 26.7)
TD <sub>50</sub> 元データ数	9試験25通り	2試験14通り	7試験44通り	1試験5通り
Source of dose-response data	CPDB_ID44012 Liver tumor, Colworth rats	CPDB_ID43995 Liver tumor, Colworth rats	CPDB_ID30829 Liver tumor, BALB/c mice	CPDB_ID884 Liver tumor, F344 rats
NOAEL	0.041	0.02		
LOAEL			3.9	3.95
BMDU <sub>10</sub>	0.0987	0.0494	6.82	0.796
BMDL <sub>10</sub>	0.0571	0.0249	5.53	0.00000492
TD <sub>50</sub>	0.157	0.0924	33.6	1.43
Liver TD <sub>50</sub> _average is an average of TD <sub>50</sub> values calculated by multiple type of liver cancer of mouse and rat studies in CPDB.				
BMD was calculated by PROAST web (Ver. 70.1) with model averaging.				





The solid line indicates the point at which the mutagenic BMDL50 values are equal to cancer BMDL10 or TD50 values. The upper and lower dashed line represent 10-fold above and below the solid line. Error bars represent the range between highest and lowest TD50 values.

図1：変異原性PODと発がん性PODの比較

令和4年度 厚生労働行政推進調査事業費 補助金（化学物質リスク研究事業）  
 化審法における発がん性定量評価を見据えた新たな遺伝毒性評価技術  
 構築のための基盤研究

分担研究課題名: Data Independent Acquisition法による  
 トキシコプロテオミクスの統合型*in vitro*遺伝毒性試験の試みと問題点

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  
 研究協力者 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部  
 分担研究者 杉山 圭一 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

**研究要旨**

将来的に動物実験の実施が困難となる可能性を見据え、*in vitro* 遺伝毒性試験から発がん性の定量的予測が可能か検証するために、有効なアプローチとしてトキシコプロテオミクスが挙げられる。それは、統合型 *in vitro* 遺伝毒性試験における Weight of Evidence アプローチの実装において重要な役割を果たす可能性がある。最近、新しい Data Independent Acquisition (DIA) 法のプロテオミクス技術が進み、他分野の研究者であっても比較的容易に利用可能になってきた。その DIA 法を遺伝毒性試験法に導入するため、本研究では、まずヒトリンパ芽球細胞 TK6 株からリシスしたタンパク質を回収し、同定数 5000 以上を目標に DIA プロテオミクスのプロトコルを確立することを目的とした。また、予備実験として TK6 細胞に過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を処理し、DNA 損傷応答中の約 6000 タンパク質について、Scaffold DIA 解析ソフトウェアおよび Metascape ウェブサイトの濃縮分析を用いて、そのデータが細胞内で起こることを正確に反映しているかを調べた。将来、遺伝毒性試験に統合することを考え、プロトコルや濃縮解析など、誰でも実施可能な方法を探索した。本研究の結果、一度の解析で TK6 細胞から安定して 5000 タンパク質数以上の同定と定量ができるプロトコルを確立することができた。また、予備実験の結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理した TK6 細胞を対象として、DIA 法によるトキシコプロテオミクスおよびその濃縮分析は、既知の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の遺伝毒性スキームどおりに、塩基除去修復などの生物活動を検出できることが示唆された。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理後に DNA 修復回路で発現増加が予想されるタンパク質が減少して検出されるなど、いくつか問題点が分かった。

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**

我々は、発がん性を有するアルキル化剤や活性酸素種が、発がん初期において、ゲノム DNA 上で一塩基変異を誘発させる DNA 付加体を形成し、塩基除去修復 (BER) 等の DNA 損傷機構を促進させる遺伝毒性スキームが存在することを知っている。例えば、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) をヒトリンパ芽球細胞 TK6 株 (TK6 細胞) に曝露し、ノンラベル

化法によるプロテオミクスおよび濃縮分析によって、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の遺伝毒性スキームどおりに、BER や酸化ストレス応答を検出できるか調べる方法が、最近利用可能になってきたと考えている。従来、定量的プロテオミクスである Selected / Parallel Reaction monitoring 法は、定量性があるが、一度に定量可能なタンパク質数がわずか 100 程度である。また、Data dependent acquisition 法は、

一度に 2000 程度のタンパク質数を同定できるが、定量性は低い (内田, 薬剤学 78, 228-234 (2018))。これらタンパク質同定数から統計的に有意差のある発現変動タンパク質を抽出しても、その数は非常に少なく、定量の信頼性も低いいため、濃縮分析の結果も期待できないと考えられる。一方、もしタンパク質同定数が飛躍的に増加し、定量性もあれば、濃縮分析も同時に信頼性のある結果がアウトプットされるのではないかと予想できる。

昨今の質量分析装置、かつその計算技術やソフトウェア開発の進展は目覚ましく、Sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra mass spectrometry (SWATH-MS) 法が構築された。先述の問題を解決し、はじめて信頼性をもって“網羅的にタンパク質 (例えば一度に約 5,000 種類) を定量できる”と考えられている。Data independent acquisition (DIA) は、MS スペクトルに依存せずに、すべての precursor ions をフラグメンテーションさせ、MS/MS スペクトルを取得する方式の総称であり、SWATH-MS はその代表的なものの 1 つである (内田, 薬剤学 78, 228-234 (2018))。

本研究では、まず TK6 細胞からリシスしたタンパク質を回収し、DIA プロテオミクス手法としてタンパク質同定数 5000 以上を目標にプロトコルを確立することを目的とした。また、予備実験として TK6 細胞に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を処理し、DNA 損傷応答中のタンパク質群について、Scaffold DIA 解析ソフトウェアおよび Metascope の濃縮分析を用いて、そのデータが細胞内で起こることを正確に反映しているかを調べた。

## B. 研究方法

### B-1. 細胞培養および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理方法

ヒトリンパ芽球細胞 TK6 株は、10%馬血清 (JRH Bioscience), 200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム (和光純薬工業株), 100 U/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン (ナカライテスク株) を含む RPMI 培地 (ナ

カライテスク株) で培養された。培養は、37 度、5% CO<sub>2</sub> 濃度存在下で行った。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の処理方法は、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ルに従って実施した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理濃度は、詳細を後述するが、40 µM とした。処理時間は、4 hours、1.5 hours、30 minutes とし、未処理群のそれらも同様に培養して、各細胞ペレット (8 x 10<sup>5</sup> cells) を用意した。

### B-2. プロテオミクスの実験デザイン、および使用した装置と解析ソフト

将来的に、遺伝毒性試験に組み込むことを見据えて、プロテオミクスや濃縮分析等の方法は、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。また、濃縮分析については、フリーで利用可能な Metascope ウェブサイト (<https://metascope.org/>) を使用し、検索データベースは KEGG (京都大学) を使用した。詳細な前処理方法や解析方法の条件は、現段階においてコンフィデンシャルとするが、以下に簡易なプロトコル概要を示した。

### B-3. プロテオミクスプロトコル

#### B-3-1) 細胞溶解液の調製

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

#### B-3-2) タンパク質の沈殿と可溶化

細胞溶解液に 4 倍量のアセトンを加え、タンパク質を沈殿させ、14,000 x g にて 15

#### 別添 4

分間遠心分離後、上清を除き、沈殿を 100  $\mu$ l の 0.1% Rapigest (Waters) に溶解させた。Qubit spectrometer (Invitrogen) にてタンパク質濃度を測定した後、タンパク質 12  $\mu$ g 相当量を取り、再び 0.1% Rapigest にて希釈し全量を 24  $\mu$ l にした。

#### B-3-3) 還元アルキル化

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

#### B-3-4) トリプシン消化

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

#### B-4. LC-MS 解析

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

#### B-5. タンパク質の同定と定量、および濃縮分析方法

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解析した。統計処理は、ソフトウェア上の t-test (有意水準;  $p < 0.05$ ) によって、未処理群に対して有意差のあったタンパク質 (Statistically Significant 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/>) を用いて濃縮分析を実施した。濃縮分析の方法は、そのウェブサイトの使用方法に従って行った。本研究では、DNA 修復、および DNA 損傷の応答

## 別添 4

に關係するジンオントロジーに焦点を当てて濃縮分析を行った。

- ・使用したソフトウェア: Scaffold DIA (Proteome Software)
    - Protein Sequence Database : Human UniProtKB/Swiss-Prot database
    - Spectral Library : 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

#### C-1. プロテオミクスプロトコールの構築

当ラボでは、初めてプロテオミクス研究を導入するため、①細胞溶解するキットの選定、②還元アルキル化のための試薬の選定、③タンパク質消化のためのトリプシンの選定、④脱塩濃縮精製のためのピペット C18 チップの選定等を検討し、プロトコールを改善した。また、LC-MS 解析においても、C18 カラム、ESI スプレーチップ等の選定、ナノ LC のグラジエント条件、および MS 装置のパラメーター設定も数々の条件で検討した。それらの結果、最初はわずか 1000 タンパク質程度の同定数であったが、TK6 細胞から得られるタンパク質溶液から 6000 前後のタンパク質同定数を安定に得られるようにした。そのプロトコールは、将来、遺伝毒性試験に統合することを考え、比較的誰でも実施可能な方法を採用した。

#### C-2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理した TK6 細胞プロテオミクス (予備実験)

まず、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 40 μM 処理した理由として、

チミジンキナーゼ遺伝子変異試験において、4 時間処理して洗浄後、24 時間回復培養後に、細胞数が約 2 倍に増殖できる用量に焦点を当てた。また、Figure 1 のとおり、40 μM の相対生存率 (Relative survival; RS) と遺伝子突然変異体率 (Mutant Frequency; MF) は、比較的毒性が低いことから、処理に対して防御反応、および生命活動を維持するために盛んにタンパク質変動が起こりうると予想される。よって、本研究では 40 μM 用量を選定した。

40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理した TK6 細胞を用いるプロテオミクス (消化物ペプチド 1 μg を導入) において、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理群 (4 h、1.5 h、30 min) と未処理群 (4 h、1.5 h、30 min) のそれぞれを Scaffold DIA 上で比較、統計的有意に増減のあったタンパク質群 SSPs を抽出し、Metascape ウェブサイトで濃縮分析を実施した。Table 1~4 に示した通り、各処理時間 4 h、1.5 h、30 min の処理群において同定できたタンパク質数は、それぞれ未処理群 6563、5833、6109 で、処理群 6738、5833、6109 であった。そのうち、Scaffold DIA の t-test で有意差の得られた SSPs は、それぞれ未処理群 931、314、613 で、処理群 719、376、632 であった。

それら SSPs を濃縮分析した結果、30 min 処理群では、「アポトーシス」、「BER およびミスマッチ修復 (MMR) を含む DNA 複製」、および「相同組換え」が、濃縮分析のトップ 20 位内にリストアップされた (Figure 2,3, Table 3)。そして、1.5 h 処理群では、「アポトーシス」がトップ 20 の 1 位にランクされたが (Figure 4, 5, Table 2)、1.5 h と 4 h の処理群では、もはや DNA 修復に関連する生物活動はランクされなかった (Table 1, 2)。

さらに 30 min 処理 2 時間回復培養させた実験も実施した (Table 4)。上記と同様の方法でプロテオミクスと濃縮分析をした結果、DNA 修復、および DNA 損傷の応答に關係するジンオントロジーがランクされることはなかった。つまり、30 min 処理直後の細胞からは「アポトーシス」、「BER および

MMR を含む DNA 複製」、および「相同組換え」を検出できた (Table 3) のに対して、30 min 処理後 2 時間回復培養群ではそれらを検出できなかった (Table 4) ことから、タンパク質の増減は予想以上に劇的に変化しており、遺伝毒性プロテオミクスに最適な用量やサンプリング時間を決めることは大変な作業であることが分かってきた。

事実、武田ら (Hirota et al., *Genes to cells* 27(5):331-344 (2022).) は、 $H_2O_2$  処理した TK6 細胞中の DNA 損傷が、すぐに修復されることを報告している。氷上で TK6 細胞に  $H_2O_2$  (80  $\mu M$ ) を 30 min 処理し、回復培養を開始後、1、5、15、30 min 後に細胞をサンプリング後にアルカリコメットアッセイを実施した。その結果、0、1、5 min では明確な DNA 損傷性を示すコメット像を検出したが、15 min 後以降の細胞からは、コメット像は未処理群のそれらと同程度になった。つまり、30 min 処理で 40-80  $\mu M$  程度の弱い  $H_2O_2$  濃度あれば、すぐに DNA 修復が行われ、回復培養 15 min までに、DNA 損傷をすべて修復できることが分かった。つまり、今回のプロテオミクス実験結果と武田らの実験結果は、非常に一致した。

以上のことから、プロテオミクスおよび濃縮分析は、既知の  $H_2O_2$  遺伝毒性スキームどおりに、短い処理時間において、BER などの生物活動を検出できることが示唆された。

### C-3. 今後の課題

本研究において、いくつか問題点を見つけることができた。まず、未処理群同士の比較において、統計的に有意な増減タンパク質が多く観察されることである。この問題は、通常の培養でも細胞分裂が非常に盛んであるため、それによる酸化ストレスや DNA 損傷が微小に生成しているものと予想された (Figure 5)。よって、それらを抑えるために培地組成を検討する必要があるかもしれない。

濃縮分析において、 $H_2O_2$  処理群の「DNA

複製」には「BER」や「MMR」などの遺伝毒性を示す影響が観察されたが、未処理群においても同様に、「DNA 複製」が観察された。双方の「DNA 複製」に關与するタンパク質群を詳細に調べると、未処理群の方は、全く毒性を示しておらず、通常生命活動としての DNA 複製であると考えられた (Figure 3)。つまり、未処理群で観察された毒性の無い「DNA 複製」と、毒性のある「DNA 複製」を一見して区別することができなかった。これを解決するには、検索する KEGG データベースを遺伝毒性用に最適化できるのであれば、濃縮分析をより正確に実施できる可能性が示唆された。

回復時間のない処理直後のサンプルでは、濃縮分析で DNA 修復関連性が見いだされたが、処理してからわずか 30 min 後であるため、 $H_2O_2$  によって誘導され発現増加したタンパク質ではなく、もともとあったタンパク質を定量している可能性がある。すなわち、修復タンパク質が、処理群よりも未処理群のほうが多く定量される場合があることが分かった。 $H_2O_2$  処理後に DNA 修復回路で発現増加が予想されるタンパク質 TOP3A が減少して検出されることもあった (Figure 6)。プロテオミクスデータの特性として、それらの解析結果が既知の遺伝毒性スキームどおりであれば問題ないとしてもよいか検討すべきと考えられる。今後、ウェスタンブロットティングの解析も進めながら、他の発がん性物質 (陽性対照物質) についても同様の遺伝毒性プロテオミクスを実施する予定である。

### 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、TK6 細胞をリシスしたタンパク質溶液から、一度の解析で 6000 前後のタンパク質同定数を安定に得られるようにした。そのプロトコールは、将来、遺伝毒性試験に統合することを考え、比較的誰でも実施可能な方法を採用した。予備的に実

## 別添 4

施した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理の実験結果のみであるが、プロテオミクスデータの特性上の問題点、およびその他のいくつかの問題点はあるものの、現時点において、DIA 法を使用したトキシコプロテオミクスデータは、*in vitro* 遺伝毒性試験に有用であることが示唆された。今後、再現性を確認しながら、他の遺伝毒性発がん性物質についても調べる予定である。

### E. 研究発表

#### E-1. 論文発表

1. Liu W, Yasui M, Sassa A, You X, Wan J, Cao Y, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y; FTO regulates the DNA damage response via effects on cell-cycle progression. *Mutat. Res.* 887:503608 (2023).

#### E-2. 学会発表

1. 安井学、鶴飼明子、足立淳、鈴木孝昌、本間正充、杉山圭一; Data Independent Acquisition 法によるトキシコプロテオミクスの統合型 *in vitro* 遺伝毒性試験の試みと問題点. 日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会 (2022.11.16)
2. 鈴木孝昌、山影康次、安井学、鶴飼明子、築茂由則、小原有弘、杉山圭一; ゲノム編集による転座染色体のデザイン合成と染色体異常誘発性. 日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会 (2022.11.16)

### F. 知的所有権の取得状況

#### F-1. 特許取得

該当なし

#### F-2. 実用新案登録

該当なし

#### F-3. その他

該当なし

別添 4

**Table 1. Number of SSPs for each 4h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment experiment and each judgment obtained by enrichment analysis using the SSPs\*1**

	Control	24h recovery	0h recovery
Total of identified proteins	6563	6528	6738
SSPs	931	674	632
	none*2	none	HR*3
SSPs detected more than Ctrl	482	283	320
	none	none	none
SSPs detected less than Ctrl	449	391	312
	none	none	none

**Table 2. Number of SSPs for each 1.5h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment experiment and each judgment obtained by enrichment analysis using the SSPs**

	Control	0h recovery
Total of identified proteins	5833	5833
SSPs	314	376
	BER*4	Apoptosis
SSPs detected more than Ctrl	131	139
	none	none
SSPs detected less than Ctrl	183	237
	none	Apoptosis

**Table 3. Number of SSPs for each 30min H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment experiment and each judgment obtained by enrichment analysis using the SSPs**

	Control	0h recovery
Total of identified proteins	6109	6109
SSPs	613	719
	DNA replication(not including GTX*5)	DNA replication including BER and MMR*6, Apoptosis, HR
SSPs detected more than Ctrl	301	385
	DNA replication(not including GTX)	DNA replication including BER and MMR, Apoptosis, HR
SSPs detected less than Ctrl	312	334
	Reactive oxygen species	none

**Table 4. Number of SSPs for each 30min H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment experiment and each judgment obtained by enrichment analysis using the SSPs**

	Control	2h recovery
Total of identified proteins	6538	6538
SSPs	496	561
	none	none
SSPs detected more than Ctrl	264	301
	none	none
SSPs detected less than Ctrl	232	260
	none	none

\*1; SSPs, Statistically Significant Proteins (t-test in Scaffold DIA software ; p<0.05)

\*2; Judgment with DNA repair related gene ontology obtained by enrichment analysis. A "none" means no DNA repair association.

\*3; HR, Homologous recombination \*4; BER, Base excision repair \*5; GTX, Genotoxicity \*6; MMR, mismatch repair



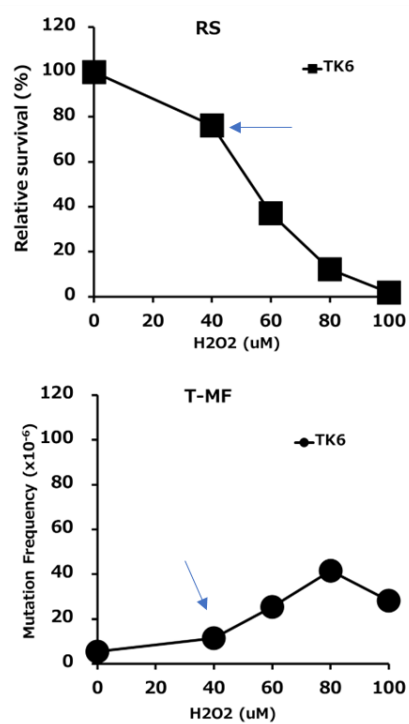
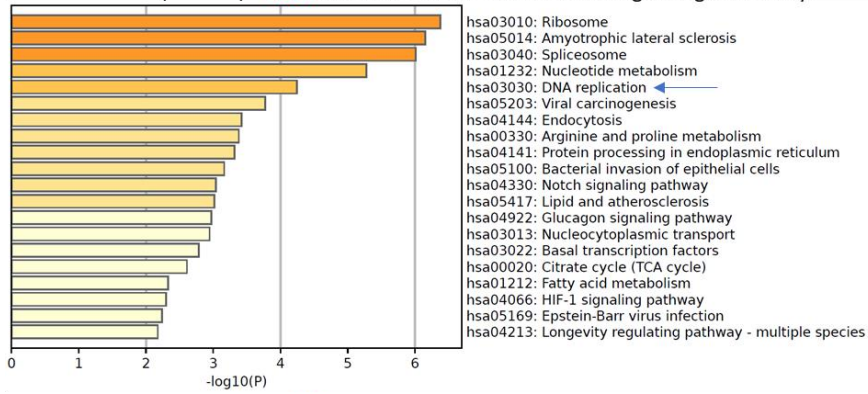


Figure 1. 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 用量のときの相対細胞生存率と遺伝子変異体頻度

No treatment (30 min) 613 SSPs were enriched in the following biological activity.



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (30 min) 719 SSPs were enriched in the following biological activity.

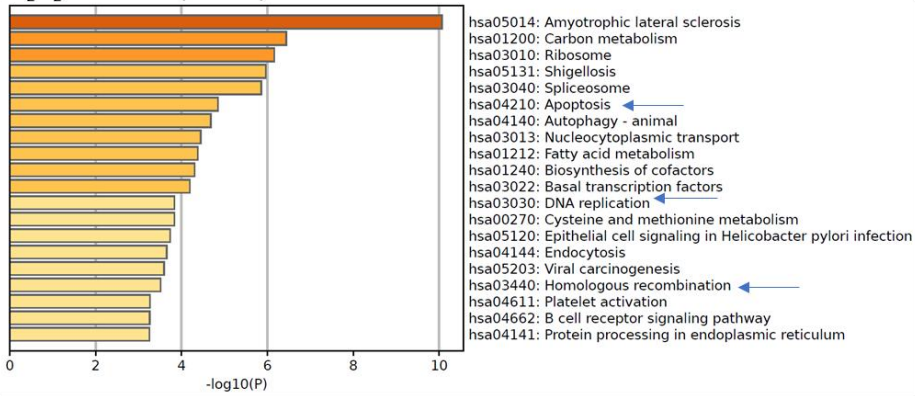
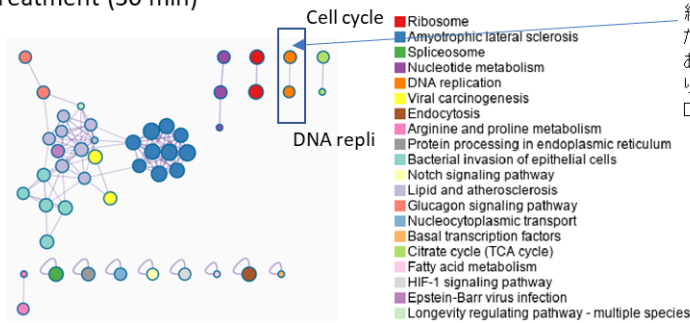


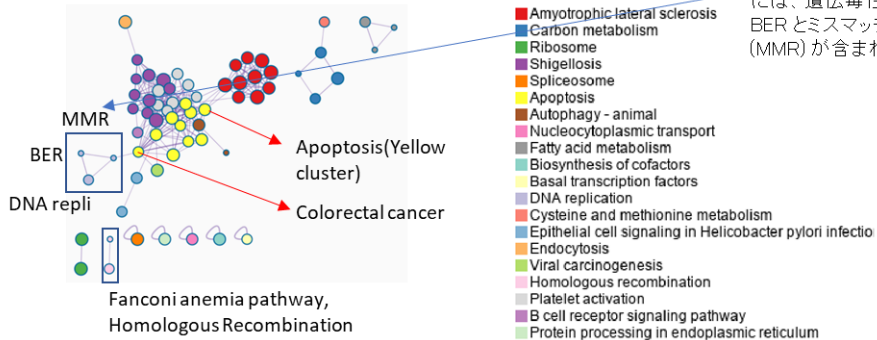
Figure 2. 30min処理実験の濃縮分析の結果 (Top 20)・・・Table 3に対応

No treatment (30 min)



未処理群のDNA複製は、細胞周期とつながっているだけで正常な生物活動であることが分かった。つまり、毒性は示されていないDNA複製だった。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (30 min)



一方、処理群のDNA複製には、遺伝毒性に関するBERとミスマッチ修復(MMR)が含まれていた。

Figure 3. 30min処理実験のクラスターネットワーク解析の結果 (Top 20)・・・Table 3に対応

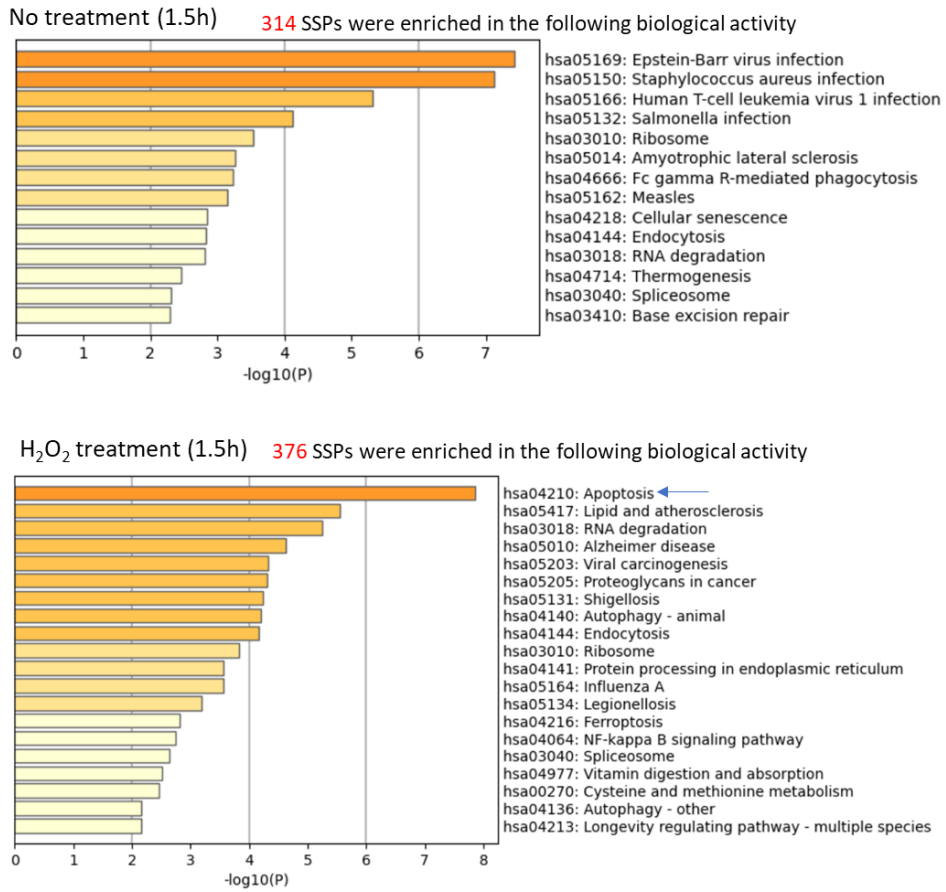
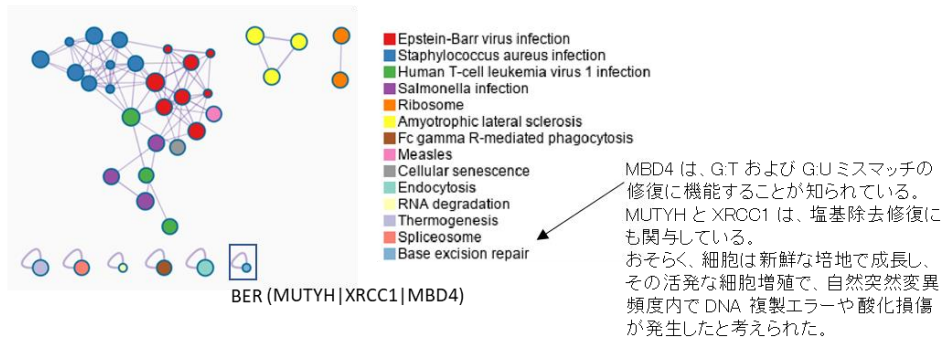


Figure 4. 1.5h処理実験の濃縮分析の結果 (Top 20)・・・Table 2に対応

No treatment (1.5h)



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (1.5h)

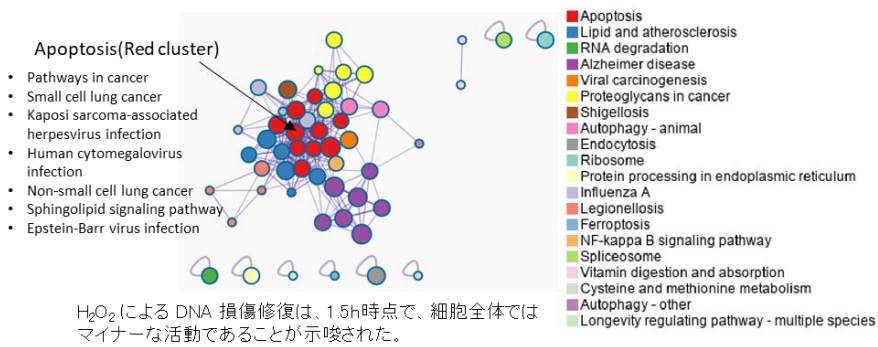


Figure 5. 1.5h処理実験のクラスターネットワーク解析の結果 (Top 20)・・・Table 2に対応

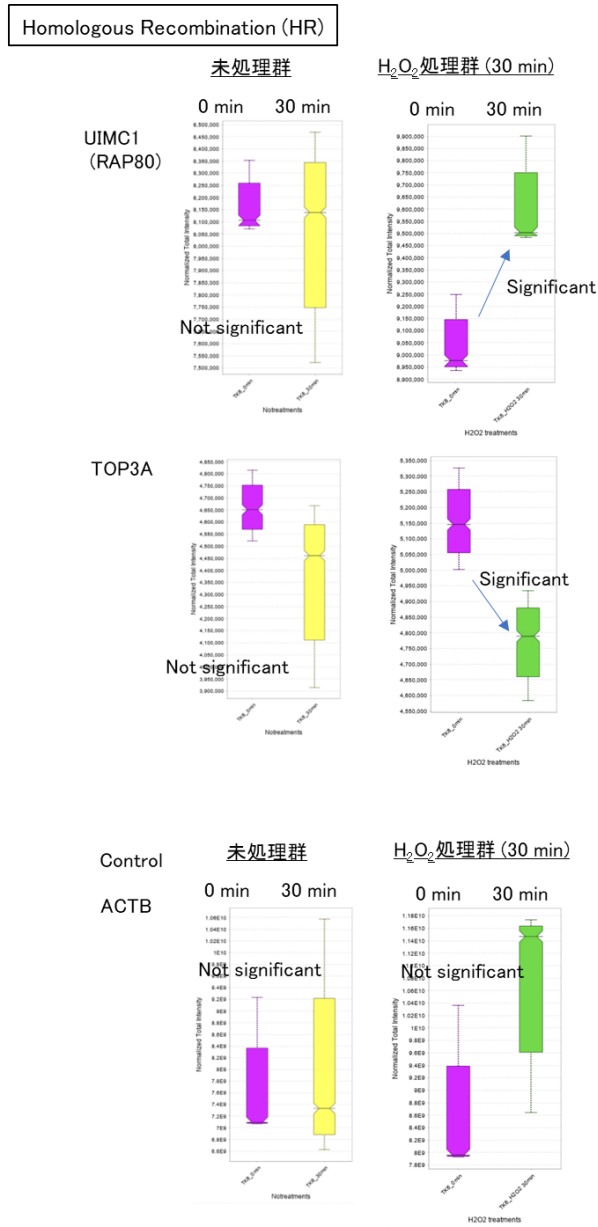


Figure 6. DNA修復回路で発現増加が予想されるタンパク質が減少して検出される例

令和4年度 厚生労働行政推進調査事業費 補助金（化学物質リスク研究事業）  
化審法における発がん性定量評価を見据えた新たな遺伝毒性評価技術  
構築のための基盤研究

分担研究課題名：固定化標本を利用した定量定性的な新規*in vitro* / *in vivo*遺伝毒性評価  
手法の開発

研究分担者 堀端 克良 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究分担者 杉山 圭一 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

**研究要旨**

化学物質等の遺伝毒性評価結果はその発がん性を評価する上で非常に重要な指標であるが、現在確立されている遺伝毒性の研究手法では、遺伝毒性と発がん性の定量定性的な相関解析は困難である。その原因として、遺伝毒性評価法と発がん性評価法におけるそれぞれの手法やエンドポイントの相違等が挙げられる。言い換えれば、遺伝毒性評価と発がん性評価を同じ研究材料・試験系等を用いてそれぞれを解析することにより相互の定量定性的な相関解析が実施可能な試験系を確立することで、遺伝毒性の定量定性評価から発がん性を定量定性的に予測するための研究基盤とすることができる。そこで、発がん性試験を含む毒性試験等から得られる組織標本を用いた定量定性的な遺伝毒性評価法の技術基盤を整備するため、クロマチン免疫沈降法（**Chromatin immunoprecipitation; ChIP**）を利用した遺伝毒性応答反応解析系に着目し、高濃度ホルムアルデヒド固定化細胞へのChIPの適用性を検証した。高濃度ホルムアルデヒド固定化における最適なリンカーDNA切断条件を検討した結果、通常のChIPに適用される1%ホルムアルデヒドで固定化した条件と同等のリンカーDNA切断条件では、3.7%ホルムアルデヒド固定化細胞のリンカーDNAの十分な切断は見られなかった。その一方で、条件検討の結果、超音波サイクルを大幅に増大することで、3.7%ホルムアルデヒド固定化細胞のリンカーDNAをChIPに供することができる大きさまで切断することができることを明らかにした。

**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。

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

一般的なChIPで用いられる細胞固定条件では1%程度のホルムアルデヒド処理によりDNA-タンパク質架橋を形成させる。続いて細胞を可溶化後、DNA-タンパク質架橋体は不溶性のクロマチンDNA画分に分画されるため、ChIPではクロマチンDNA画分に存在

するヌクレオソーム間のリンカーDNAを超音波等により切断し、クロマチンDNA画分中のDNA-タンパク質架橋体を可溶化させ、以降の免疫沈降に供する。その一方で、組織固定は一般的に10%ホルマリン液が使用されるが、これはホルムアルデヒドとしては概ね3.7%である。従って、従来の一般的なChIPの実験条件とは大きく異なり、固定標本ではより高濃度のホルムアルデヒドにより、強固にDNA-タンパク質架橋が形成されていると考えられる。そこで、組織固定標本へのChIPの適用性を見据えて、高濃度ホルムアルデヒド固定化条件下におけるリンカーDNAの切断条件の検討を実施した。

ChIPを用いた遺伝毒性反応解析に実績のある293細胞を用いて、組織固定標本作成で使用される濃度と同等の3.7%、または従来の一般的なChIPで用いられる1%ホルムアルデヒド処理によりそれぞれ細胞を固定した。その後、サンプル密閉式冷却超音波破碎装置とそれに付属するマイクロチューブ型またはプローブ型の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切断条件を見出すため、各条件下で超音波処理を実施し、続いてDNA-タンパク質架橋を脱架橋後にDNAを精製して電気泳動法によりDNAの定性解析を実施した。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C. 研究結果

1%のホルムアルデヒドで固定化した293細胞では、マイクロチューブ型超音波処理システムにおいて30 cycleのリンカーDNA切断超音波処理では高分子DNAの残存が見られたが、45 cycleでは高分子DNAはほぼ消失し、500~100 bpの大きさのDNA画分が得られた (図2)。その一方で、3.7%のホルムアルデヒドで固定化した293細胞では、マイクロチューブ型超音波処理システム30 cycle



の超音波処理ではほぼ全てが高分子DNAの状態であり、また、超音波処理cycle 数の増加に応じて500~100 bpの大きさのDNA画分のわずかな増加が見られたが、1%ホルムアルデヒド固定化の超音波45 cycle処理で見られたような十分な量のDNA量は見られなかった。75 cycleまで超音波処理を続けると500~100 bpの大きさのDNA画分の増加は見られるものの、高分子DNAの消失はほとんど見られなかった(図2)。続いて、より強力なリンカーDNA切断が期待できるプローブ型超音波処理システムを用いて同様の解析を実施したが、マイクロチューブ型と同様の結果であった(図3)。

引き続き、リンカーDNA切断条件の最適化のため、マイクロチューブ型超音波処理システムにおいて125 cycleまで超音波処理を実施した。その結果、1%ホルムアルデヒドで固定化した293細胞では45 cycleが最適であるという再現性が得られた。また、3.7%ホルムアルデヒドで固定した293細胞では105 cycle以上で高分子DNAが完全に消失し、また、十分な量の500~100 bp DNA画分が得られることが明らかになった(図4)。

#### D. 考察

1%のホルムアルデヒドで固定化した293細胞では45 cycleのマイクロチューブ型超音波処理で高分子DNAがほぼ消失し、500~100 bpの大きさのDNA画分が得られたが、この結果は従来のChIPの超音波処理条件で得られるDNA画分と同様であった。一般的にChIPでは高分子DNAを残さずに500~100 bpの大きさのDNA画分となるようにDNAを切断した上で免疫沈降を実施するため、このリンカーDNA切断条件はChIP法に最適なDNA切断条件であるといえる。その一方、3.7%のホルムアルデヒドで固定化した293細胞においては、75 cycleまでマイクロチューブ型超音波処理を続けても高分子DNAの消失は見られず、また、得られた500~100 bpの大きさのDNA画分の量は1%ホルムアルデヒドで固定化した際と比較して明

らかに少ない。また、より強力なリンカーDNA切断が期待できるプローブ型超音波処理システムを用いても同様の結果であったことから、3.7%ホルムアルデヒド固定化におけるリンカーDNA切断の最適化条件は、超音波の強度よりもむしろ超音波処理cycleに依存している可能性が示された。実際、マイクロチューブ型超音波処理システムにおいて125 cycleまで処理を実施した結果、105 cycle以上で高分子DNAが完全に消失が見られたことはこの可能性を支持するものであると言える。

今回の結果から、3.7%ホルムアルデヒド固定化条件においても、105 cycle以上の処理でChIPに最適とされるサイズのDNA画分が得られることが明らかになった。また、マイクロチューブ型超音波処理システムはそれぞれのサンプルをマイクロチューブに個別に密閉した状態での超音波処理が可能であるため、この方法で最適なDNA切断条件が得られたことは今後の実験を進めるハンドリング上、非常に有望である。

その一方で、105 cycle以上というのは一般的なChIPの条件と比較すると非常に長期の超音波処理条件であり、極端に長期の超音波処理を加えることで目的とするDNA損傷応答タンパク質そのものが負の影響を受ける可能性も考えられる。従って、ChIPを用いた遺伝毒性反応解析に実績のあるDNA損傷応答タンパク質を認識する抗体についても、どの抗体であればこの超音波処理条件で確実に遺伝毒性反応を検出できるかどうかの検討が必要になる可能性がある。

#### E. 結論

発がん性試験を含む毒性試験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、高濃度ホルムアルデヒド固定化細胞へのChIPの適用性を検証した。そのため、最適なリンカーDNA切断条件を検討した結果、1%ホルムアルデヒドで固定化した条件と同等のリンカーDNA切断条件では、3.7%ホルムアルデヒ

## 別添 4

ド固定化細胞のリンカーDNAの十分な切断は見られなかった。その一方で、超音波のサイクルを大幅に増やした結果、3.7%ホルムアルデヒド固定化細胞のリンカーDNAはChIPに供することができる大きさまで切断することができることを明らかにした。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Grúz P, Yasui M, Ukai A, Horibata K, Honma M, Sugiyama KI. Potent mutagenicity of an azide, 3-azido-1,2-propanediol, in human TK6 cells. *Mutation Research* 876–877, 50347531, 2022
2. Iso T, Natsume M, Murata Y, Shigeta Y, Hirose N, Umano T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama KI, Matsumoto M, Hirose A. Absence of *in vivo* mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfonohydrazide) in liver and glandular stomach of Muta<sup>TM</sup> Mouse. *Fundamental Toxicological Sciences* 9(2), 31-36, 2022
3. Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K. Genotoxicity assessment of food-flavoring chemicals used in Japan. *Toxicology Reports* 9, 1008-1012, 2022
4. Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S. In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. *Genes and Environment* 44, 24, 2022
5. Murata Y, Natsume M, Takako I, Shigeta Y, Hirose N, Umano T, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K, Hirose A, Matsumoto M: In vivo mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver

and lung. *Genes and Environment*. in press, 2023

### G-2 学会発表

1. 磯貴子, 村田康允, 重田善之, 広瀬望, 馬野高昭, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦. Evaluation of the in vivo mutagenicity of Carbendazim. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30. 札幌)
2. 村田康允, 磯貴子, 重田義之, 広瀬望, 馬野高昭, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦. The gene mutation test of styrene using the transgenic mouse. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30. 札幌)
3. Horibata K, Sugiyama KI. Detection of Genotoxic Reactions Through Directly Analyzing DNA Damage Responses on Chromatin Fraction. 13th International Conference on Environmental Mutagens and 53rd Annual Meeting of The Environmental Mutagenesis and Genomics Society (2022.8.27. Ottawa, Canada)
4. Gruz P, Yasui M, Ukai A, Horibata K, Honma M, Sugiyama KI. Potent mutagenicity of azidoglycerol in human TK6 cells. 7th Asian Conference on Environmental Mutagens and the 19th Conference of Chinese Environmental Mutagen Society (2022.11.5. Qingdao, China & On line)
5. 堀端克良, 木本崇文. Pig-a アッセイ. 哺乳動物試験研究会 第 81 回定例会 (2022.11.14. 広島)
6. 堀端克良, 杉山圭一. クロマチン分画上の DNA 損傷応答解析による遺伝毒性反応の検出. 日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会 (2022.11.15. 広島)
7. グルーズ ピーター, 清水雅富, 台蔵彩子, 川田憲一, 山田雅巳, 本間正充, 堀端克良, 杉山圭一. Dietary lipids as a

#### 別添 4

source of etheno-DNA damage. 日本環境  
変異原ゲノム学会第 51 回大会  
(2022.11.15. 広島)

#### **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

### ChIP assayを利用したDNA損傷応答の検出

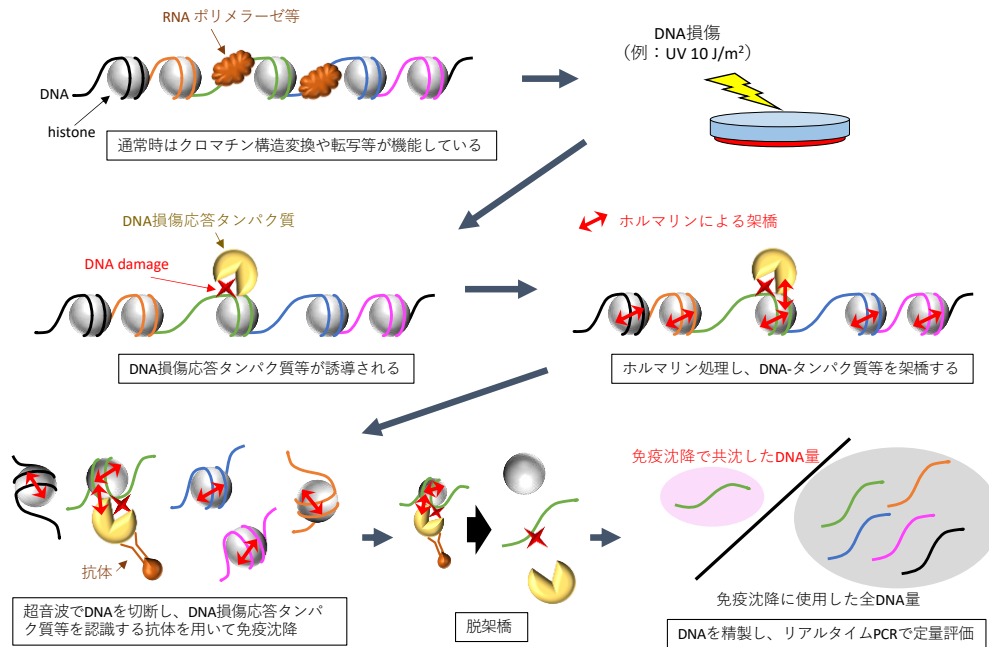


図1.ChIP assayを利用したDNA損傷応答の検出

### Ultra sonic digestion (micro tube)

Formaldehyde conc. 1% vs 3.7%

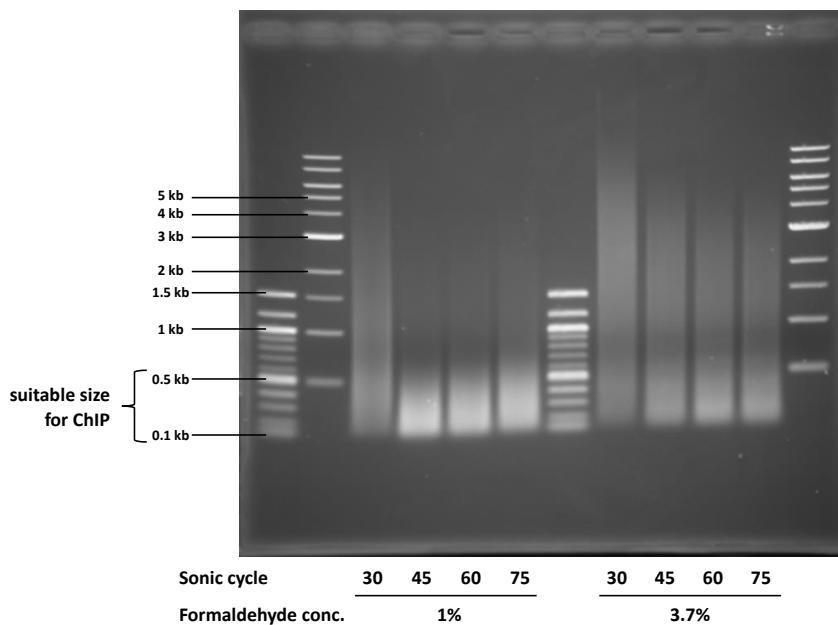


図2.マイクロチューブ型超音波処理システムによるリンカーDNAの切断(~75 cycle)

### Ultra sonic digestion (centri. tube with probe)

Formaldehyde conc. 1% vs 3.7%

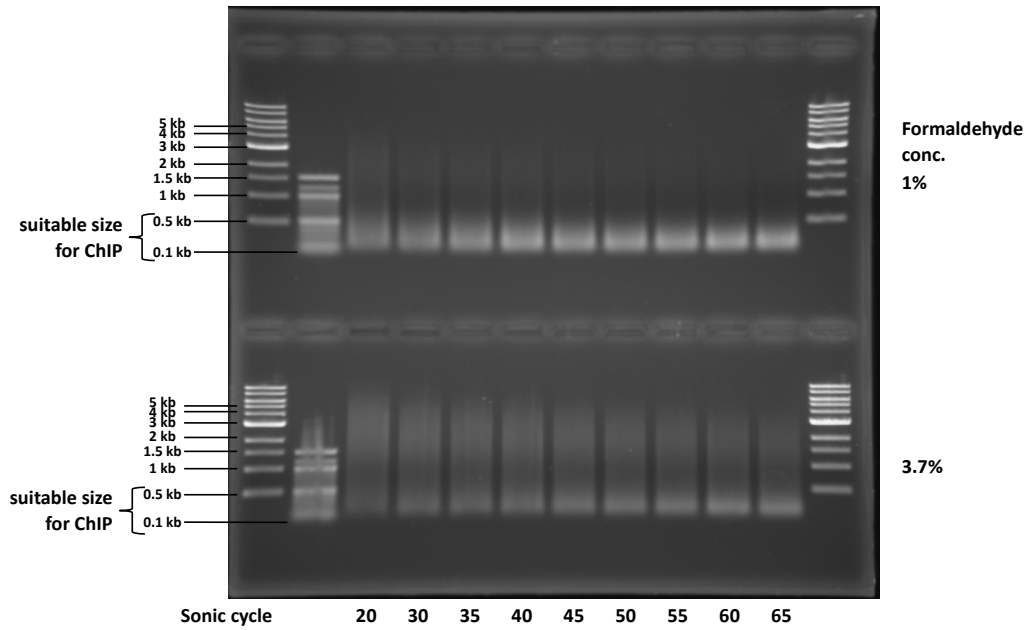


図3.プローブ型超音波処理システムによるリンカーDNAの切断(~65 cycle)

### Ultra sonic digestion (micro tube)

Formaldehyde conc. 1% vs 3.7%

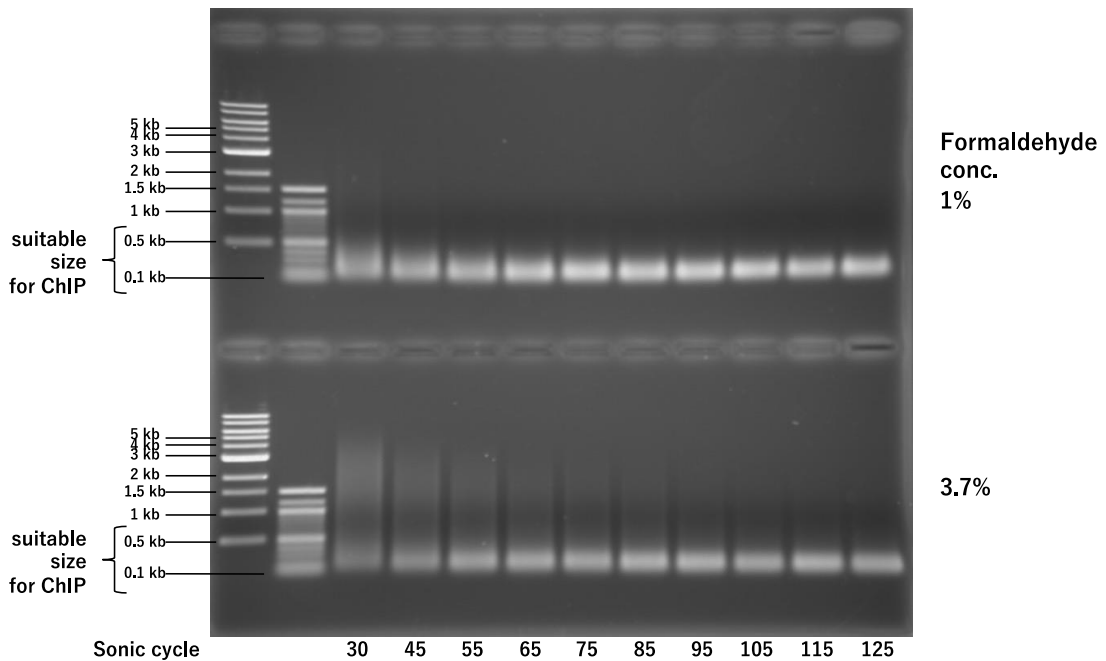


図4.マイクロチューブ型超音波処理システムによるリンカーDNAの切断(~125 cycle)

令和4年度 厚生労働行政推進調査事業費 補助金（化学物質リスク研究事業）  
化審法における発がん性定量評価を見据えた新たな遺伝毒性評価技術  
構築のための基盤研究

分担研究課題名：染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の検討

研究分担者 石井 雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

**研究要旨**

本研究では、染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の確立を目的として、病理組織学的手法による小核を有する細胞（micronucleated cell; MNC）の定量解析法の構築と、染色体不安定性による化学発がん機序の解明を実施した。本年度は、MNCの指標となる因子を検索するため、肝臓に小核を誘発するacetamide (AA)、N-nitrosopropylamine及びquinolineをF344ラットに2又は4週間投与し、肝臓についてcDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、34個の遺伝子が3剤に共通して発現増加することを明らかにした。今後、これらの遺伝子がコードするタンパクについて免疫組織化学染色による検出を行い、MNCの指標としての有用性を検討する。染色体不安定性による化学発がん機序として、AA誘発肝腫瘍における原因遺伝子の探索を行った結果、融合遺伝子の発現は確認されなかった。一方、腫瘍では様々ながん遺伝子のコピー数増加が高頻度に確認され、その一つであるc-Mycタンパクの発現はhepatocellular carcinomaの86.3%で陽性所見が認められたことから、Mycのコピー数増加はAAの肝腫瘍誘発過程における重要なイベントであることを明らかにした。

**A. 研究目的**

化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）における優先評価化学物質のリスク評価（一次）では、遺伝毒性試験の情報があるにもかかわらず、発がん性試験結果の情報がない優先評価化学物質については、発がん性の定量的評価を行うことができない。そのため、優先評価化学物質に指定された閾値なし発がん性の懸念を有する物質が評価Ⅱ段階に停滞しないよう、多数の動物や時間・費用を要する発がん試験に代わる、新たな発がん性定量的評価手法の開発と確立が求められている。そこで本研究では、新たな発がん性定量評価を見据えた基盤研究として、染色体不安定性を指標とする発がん性定量的評価法を検討する。染色体不安定性や細胞分裂異常の結果生じる小核（micronucleus）は、化学物質の安

全性評価において古くから染色体異常の指標として用いられてきた。しかしながら、小核そのものの意義や小核が生じた細胞に及ぼす影響については長い間不明なままであった。しかし近年、chromothripsisと呼ばれる現象が明らかになり、小核そのものが発がんの原因になることが報告されている<sup>1)</sup>。Chromothripsisは、小核の核膜の崩壊と染色体の粉碎・再構成の後、細胞質に漏出した染色体が細胞分裂の際に主核に取り込まれる現象である。取り込まれた異常な染色体は劇的な遺伝子変異を引き起こし、一度に複数のがんの発生や進行に関わる遺伝子の発現変化が生じると考えられている<sup>1)</sup>。実際、chromothripsisの痕跡とされる複雑なコピー数変異は、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンセス解析によって様々なヒト腫瘍で見つかっており、これら

腫瘍の発生や悪性化の過程に小核が寄与していることが示唆されている<sup>2,3)</sup>。また、ラット肝臓小核試験の結果が遺伝毒性の有無にかかわらず、肝発がん性と高い相関があることが報告されており<sup>4)</sup>、化学発がんの根底にも染色体不安定性が寄与することが示唆されている。

このような背景から、染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法として、小核を有する細胞（micronucleated cell; MNC）の免疫組織化学染色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* 小核試験が報告されているが、肝臓のように肝細胞が大部分を占めるような臓器ばかりでなく、特徴の異なる複数の細胞から構成されている。それ故、病理組織学的に MNC を検出することで、陽性となる領域や細胞を特定することが可能になる。また、肝臓小核試験の反復投与方法では 28 日間投与が高感度であることから<sup>4)</sup>、MNC を検出する本法は化審法における 28 日間反復投与毒性試験への組み込みにも適していると考えられる。さらに、過去に実施した毒性試験のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）試料を用いた評価も期待される。

本研究では、小核を有する肝細胞（MNHEP）が発現するタンパクを検索することで、免疫組織化学染色法による MNC の検出法の構築を試みる。令和 4 年度は異なる機序で小核を誘発する肝発がん物質 acetamide (AA)、*N*-nitrosopropylamine (NNP) 及び quinoline を投与したラット肝臓について、cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施し、3 剤に共通して発現増加する遺伝子を抽出した。

また、染色体不安定性が化学物質の発がん性評価の指標になりうる根拠として、染色体不安定性による化学発がん機序の解明を行う。前述したように chromothripsis は様々な腫瘍の発生や悪性化に寄与すると考えられている。一方、小核を誘発するラット肝発がん物質は数多く報告されているものの、化学発がん過程における

chromothripsis の関与についてはこれまでに報告はない。

本研究では、染色体不安定性による化学発がん機序の解明として、特徴的な大型小核を誘発するラット肝発がん物質 AA<sup>5,6)</sup>で誘発した肝腫瘍における染色体粉碎と再構成の痕跡を検索することで、発がん過程における chromothripsis の関与について検討する。令和 4 年度は AA で誘発した肝腫瘍における融合遺伝子の検索と、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析の結果を用いて、発がんに寄与するがん遺伝子を検索した。

## B. 研究方法

### B-1. 材料および試薬

肝臓小核を誘発する既知の化学物質の中から、AA、NNP 及び quinoline を選定した。NNP (>98%) 及び quinoline (>97%) は東京化成工業（東京）から購入した。

### B-2. 染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の検討

NNP 及び quinoline の投与は、既知の報告を基に各物質が小核を誘発する条件とした。雄性 5 週令の F344 ラットを日本エスエルシー株式会社より購入し、CRF-1 粉末基礎飼料（オリエンタル酵母工業株式会社、東京）と水道水で飼育した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物にて行った。室内の環境は温度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社（東京）のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飼料及び水道水は試験期間中、自由に摂取させた。一週間の馴化期間の後、ラット 15 匹を各群 5 匹に配し、対照群と NNP 投与群、quinoline 投与群を設けた。NNP は 40 mg/kg 体重/日の用量で、quinoline は 120 mg/kg 体重/日の用量で 2 週間強制経口投与

した。対照群には溶媒として用いたコーン油を投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施した。最終投与の翌日にイソフルラン麻酔下にて腹部大動脈より放血し、肝臓を採取し、重量測定後、一部を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリンエオジン染色を施して病理組織学的検索を行った。一部は RNA 抽出用として、Isogen<sup>®</sup> (ニッポン・ジーン社、東京) に浸漬し、ホモジナイズ後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。残りの肝臓は液体窒素により急速凍結して $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。また、AA (>98%, 東京化成工業), を 1.25% の濃度で 28 日間混餌投与した雄性 F344 ラットから採取した肝臓の凍結組織、Isogen<sup>®</sup> 凍結組織、ホルマリン固定臓器及び組織切片を実験に供した。

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<sup>7)</sup>。2~3 mm 大にカットした肝組織 10 個を 12N 水酸化カリウム溶液に入れ、室温で 16 時間インキュベーションし、洗浄後、水でホモジナイズした。遠心分離後、10%中性緩衝ホルマリンで洗浄し、固定した。細胞懸濁液を SYBR Gold で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。2000 個の肝細胞 (HEPs) をカウントし、そのうち小核を有する肝細胞 (MNHEPs) の割合を算出した。主核の直径の 1/4 以下の物を通常の小核 (MN), 1/2~1/4 の物を大型の小核 (LMN) としてカウントした。

cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析では、Isogen<sup>®</sup>でホモジナイズした肝組織から、常法に従い total RNA を抽出した。RNA 濃度は NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific 社、米国) で測定し、RIN の評価は RNA6000 Nano kit および Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent 社、米国) により測定した。200 ng の total RNA からビオチン標識 cRNA を合成し、1.65  $\mu\text{g}$  の cRNA にて Whole Rat Genome Microarray Ver 3.0 4x44K (G2519F#28282, Agilent 社) にハイブリ

ダイズした。アレイのスキャンは、Agilent Microarray Scanner で解析した。階層クラスタリングなどのアレイデータマイニング解析には GeneSpring GX ver.14.9 を用い、擬陽性率 (FDR; false discovery rate) を 0.05 以下、かつ Cut off 値を発現量比 (FC; fold change) >2.0 で条件を満たす転写産物をマイクロアレイデータから抽出した。これらの遺伝子から AA, NPP 及び quinoline の投与により共通して発現増加する遺伝子を検索した。

### B-3. 染色体不安定性による化学発がん機序の解明

過去に F344 ラットに acetamide を 2.5% の濃度で 26~30 週間混餌投与し、得られた肝腫瘍の標本及び凍結組織と、hepatocellular adenoma (HCA) と診断された腫瘍 8 例と hepatocellular carcinoma (HCC) と診断された腫瘍 7 例について実施した NGS による全ゲノム解析のデータを解析に用いた。

融合遺伝子解析はタカラバイオ株式会社 (滋賀) にて RNA-Seq を用いて実施した。HCA 8 例、対照群の正常肝組織 2 例から抽出 total RNA を送付し、mRNA 精製、断片化及び cDNA 合成によりライブラリーを作成し、次世代シーケンサーを用いたペアエンドシーケンスを行い、融合遺伝子を検出した。

c-Myc の免疫組織化学染色には、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋された腫瘍組織標本を用いて作成した切片を用いた。キシレン、無水エタノールにて脱パラフィンした後、3% $\text{H}_2\text{O}_2$  にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、1 次抗体として abcam 社製 (英国) 抗 Myc ラビットポリクローナル抗体を用い、室温で 1 時間インキュベートした。Phosphate-buffered saline にて洗浄後、2 次抗体としてニチレイバイオサイエンス社製 (東京) ヒストファイン シンプルステイン (ウサギ第一抗体用) にて 30 分間インキュベートした。



発色には diaminobenzidine を用いた。なお、比較として diethylnitrosamine (DEN) と phenobarbital で誘発した HCA 及び HCC についても染色を行った。

*Myc* 遺伝子の挿入部位は、ピージーエル社 (愛知) にて PGL 法による DNA の挿入位置解析により行った。ラット *Myc* 遺伝子特異的プライマー (5'末端ピオチン化) と任意プライマーを用いて、*Myc* 遺伝子の近傍配列を増幅した。アフィニティー精製により、近傍配列を含む PCR 産物を濃縮し、濃縮された PCR 産物を鋳型にして再度 PCR を行い、*Myc* 遺伝子の近傍配列を特異的増幅した。アガロース電気泳動による DNA フラグメントを分取後、キャピラリーシーケンサーにより近傍配列を解析し、*Myc* 遺伝子の挿入部位を検索した。

(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。

## C. 研究結果

### C-1. 染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の検討

NNP 及び quinoline 投与群では投与開始 1 週目から体重増加抑制が認められ、最終体重は対照群に比して有意な低値を示した (Fig.1)。肝臓の絶対重量及び相対重量において、NNP 投与群では有意な低値が、quinoline 投与群では有意な高値が認められた (Table 1)。病理組織学的検索の結果を Figure 2 及び Table 2 に示す。NNP 投与群の肝臓では、肝細胞においてカリオメガリー、肝細胞のアポトーシス像、空胞化及び有糸分裂像がみられた。またオーバルセル過

形成、胆管過形成を認めた。また、quinoline 投与群ではカリオメガリーがみられた。

AA, NNP 及び quinoline を投与したラット肝臓のホルマリン固定組織を用いて、肝臓小核試験を実施した。AA, NNP 及び quinoline 投与群では MNHEP の有意な増加が認められた (Fig. 3A)。AA 投与群で認められた小核のうち 11.3%が MN, 88.7%が LMN だったのに対し、NNP 投与群では 88%が MN, 12%が LMN, quinoline 投与群では 90%が MN, 10%が LMN であった (Fig. 3B)。

肝臓のマイクロアレイ解析で認められた遺伝子発現変化について、クラスタリング解析の結果を Figure 4 に示す。いずれの投与群も対照群とは異なるクラスターとして分類された。また、AA, NNP 及び quinoline 投与群は異なるクラスターとして分類された。肝臓において発現増加及び低下した遺伝子のベン図を Figure 5 に示す。AA, NNP 又は quinoline 投与によって発現増加した遺伝子は 332, 2932 又は 803 個となり、それらのうち 34 個の遺伝子が 3 剤に共通していた。また、AA, NNP 又は quinoline 投与によって発現低下した遺伝子は 958, 3189 又は 561 個となり、それらのうち 160 個の遺伝子が 3 剤に共通していた。

### C-2. 染色体不安定性による化学発がん機序の解明

Acetamide 誘発 HCA 8 例、正常肝組織 2 例の融合遺伝子解析の結果を Figure 6 に示す。HCA と正常組織で検出された遺伝子数に差は見られなかった。また、HCA で認められたキナーゼやがん関連遺伝子を含む融合遺伝子 *Tgfr2-Slc25a37*, *Pdgfrb-Memo1*, *Egfr-Ppp3r1* 及び *Anks1a-Map2k4* について PCR 法によるバリデーションを行ったものの、増幅は認められなかった。

Acetamide 誘発腫瘍の原因遺伝子を検索するため、主要ながん遺伝子のコピー数を解析した。その結果、7 番染色体の *Myc*

遺伝子を含む領域は HCA 8 例中 5 例, HCC 7 例中 6 例で, *Mdm2* 遺伝子を含む領域は HCA 8 例中 2 例, HCC 7 例中 4 例でコピー数増加が確認された (Fig. 7).

免疫組織化学染色法を用いて *Myc* 遺伝子がコードする c-*Myc* タンパクの検出を行った結果, コピー数増加がみられた acetamide 誘発肝腫瘍の一部は, 腫瘍細胞の核に陽性所見を認めた (Fig. 8). さらに, 採取した腫瘍組織切片について免疫組織化学染色を施した結果, HCA の 39.3%, HCC の 86.3%で陽性所見を認めた (Fig. 9). 一方, DEN と phenobarbital で誘発した肝腫瘍において陽性所見は認められなかった.

コピー数増加がみられた HCC 1 例について, PGL 法による *Myc* 遺伝子の挿入部位解析を実施した. その結果, 5'末端側の検索において検出された 5 つのバンドのうちの 1 つは, 通常 *Myc* が存在する 7 番染色体とは異なる配列を示し, BLAST による相動性検索の結果, 5 番染色体と逆位で結合していることが明らかになった (Fig. 10). 一方, 3'末端側の解析ではバンドが検出されず結合部位については明らかにならなかった.

## D. 考察

### D-1. 染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の検討

MNC の指標となる因子を検索するため, 肝臓において小核を誘発する肝発がん物質として, それぞれ特徴の異なる AA, NNP 及び quinoline を被検物質として選定した. 肝臓小核試験の結果, 3 剤とも MNHEP の割合が有意に上昇したものの, acetamide では大型小核が 90%程度を占めたのに対し, NNP 及び quinoline 投与群では小型小核が 90%を占め, 小核誘発機序が異なることが示された. マイクロアレイ解析の結果, 被検物質を投与したラット肝臓では, それぞれ多くの遺伝子の発現変動がみられたものの, 共通して発現増加した遺伝子は 34 個

であった. これらの遺伝子には, 肝細胞における小核の形成に伴って発現誘導される遺伝子が含まれると考えられた. 今後, これらの遺伝子がコードするタンパクの免疫組織化学染色を検討し, 病理組織学的に MNHEP の検出を試みる.

### D-2. 染色体不安定性による化学発がん機序の解明

融合遺伝子解析では, 腫瘍と正常組織において検出された遺伝子数に差は認められず, キナーゼやがん関連遺伝子を含む融合遺伝子のバリデーションの結果も陰性であったことから, 腫瘍形成にかかわる融合遺伝子の形成は確認できなかった. 一方, AA 誘発肝腫瘍では, *Myc* 遺伝子や *Mdm2* 遺伝子といった複数のがん遺伝子に同時にコピー数変異が生じていることが明らかになった. これは大型でランダムなコピー数変異が生じた結果と考えられ, chromothripsis による発がんの特徴と一致していた. また, HCC の 86.3%が c-*Myc* 陽性であったことは, c-*Myc* 陽性の肝腫瘍が効率に悪性化していることを示唆するものと考えられた. また, HCC 1 例で認められた *Myc* 遺伝子を含む 7 番染色体のコピー数増加領域が 5 番染色体と逆位で結合していた事実は, 発がん過程において染色体再構成が生じたことを示唆するものと考えられた.

## E. 結論

特徴の異なる肝臓小核誘発物質 3 剤の投与によって, 共通して発現増加する遺伝子 34 個を抽出した. これらの遺伝子の中には小核の形成に伴い発現誘導した遺伝子が含まれると考えられた. AA 誘発腫瘍では, 融合遺伝子の発現は見られなかったものの, 複数のがん遺伝子のコピー数増加がみられた. さらに, *Myc* 遺伝子を含む領域と他の染色体との結合は, 発がん過程における chromothripsis 様の染色体再構成の寄与を示唆するものと考えられた.

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究成果

### G-1. 発表論文

1. Ishii Y., Namiki M., Takasu S., Nakamura K., Takimoto N., Mitsumoto T., Ogawa K. Lack of genotoxic mechanisms in isoeugenol-induced hepatocellular tumorigenesis in male B6C3F1 mice. *Jpn. J. Food Chem. Safety*. 2022, in press.
2. Takasu S., Ishii Y., Namiki M., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Nohmi T., Ogawa K. Comprehensive analysis of the general toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 3-acetyl-2,5-dimethylfuran in male gpt delta rats. *Food Chem. Toxicol.* 2023, 172, doi: 10.1016/j.fct.2022.113544.
3. Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Matsushita K., Kijima A., Nohmi T., Umemura T. Toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 2-methylfuran in a 90-day comprehensive toxicity study in gpt delta rats. *Food Chem. Toxicol.* 2022, 168, doi: 10.1016/j.fct.2022.113365.
4. Ishii Y., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Namiki M., Takasu S., Ogawa K. Visualization of the distribution of anthraquinone components from madder roots in rat kidneys by desorption electrospray ionization-time-of-flight mass

spectrometry imaging, *Food Chem. Toxicol.* 2022, 161, doi: 10.1016/j.fct.2022.112851.

5. Ogawa K., Ishii Y., Toyoda T. Role and potential of histopathological specimens in the toxicological evaluation of pharmaceuticals and chemicals. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2022, 157, 139-145, doi: 10.1254/fpj.21102.

### G-2. 学会発表

1. アセトアミドのラット肝発がん機序における chromoanagenesis の関与の可能性, 瀧本憲史, 石井雄二, 中村賢志, 並木萌香, 高須伸二, 満元達也, 渋谷 淳, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
2. gpt delta ラットを用いた肝中期試験法による 6-methoxyquinoline の in vivo 遺伝毒性・発がん性の評価, 高須伸二, 石井雄二, 瀧本憲史, 元達也, 相馬明玲, 能美健彦, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
3. gpt delta ラットを用いた包括的毒性試験による 2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutylamide (ITB) の評価, 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 並木萌香, 高須伸二, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
4. Acetamide 投与ラットの肝臓に生じる大型小核の形成機序, 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
5. 全ゲノム解析から明らかになった acetamide のラット肝腫瘍形成におけるがん遺伝子 c-Myc の関与, 石井雄二, 中

#### 別添 4

- 村賢志, 高須伸二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 小川久美子, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
6. ラット肝細胞における Acetamide の大型小核誘発機序に関する研究, 瀧本 憲史, 石井 雄二, 満元 達也, 並木 萌香, 高須 伸二, 渋谷 淳, 小川 久美子, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
  7. アカネ色素のラット腎臓における部位特異的な腫瘍形成の機序, 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 並木萌香, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
  8. フランのラット肝発がん葉特異性に着目した変異原性評価, 日比大介, 高須伸二, 石井雄二, 梅村隆志, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
  9. gpt delta マウスを用いたアクリルアミドの生殖器細胞変異原性と次世代個体ゲノム変異, 増村健一, 安東朋子, 石井雄二, 杉山圭一, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
  10. 病理学から見た化学物質安全性評価におけるイメージング質量分析の有用性, 石井 雄二, 第 47 回日本医用マスマスベクトル学会年会 シンポジウム 2022 年 9 月, Web
  11. Acetamide の肝発がん機序に関する検討: 血液及び肝臓中動態のラット系統差の比較, 石井雄二, 瀧本憲史, 河上強志, 田原麻衣子, 中村賢志, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 小川久美子, 第 49 回日本毒性学会学術集会 2022 年 6 月, 札幌
  12. Acetamide が誘発するラット肝細胞における大型小核の形成機序, 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, 第 49 回日本毒性学会学術集会 2022 年 6 月, 札幌
  13. ラット肝発がん物質フラン投与による SOX9 陽性肝細胞の葉特異的出現, 相馬明玲, 石黒聖奈, 日比大介, 高須伸二,

石井雄二, 梅村隆志, 第 49 回日本毒性学会学術集会 2022 年 6 月, 札幌

#### 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

#### I. 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.
- 7) Hamada S, Shigano M, Kawakami S, Ueda M, Sui H, Yamada K, Haio S, Momonami A, Maeda A, Terashima Y, Ohyama W, Morita T, Hayashi M, Evaluation of the novel liver micronucleus assay using formalin-fixed tissues. *Genes Environ.* 2019, 41, 13, doi:10.1186/s41021-019-0128-5.

Table 1 Body and organ weights data for F344 rats treated with NNP and quinoline for 2 weeks

	Control	NNP	Quinoline
No. of animals	5	5	5
Body weight	205.4 ± 10.6 <sup>a</sup>	148.6 ± 4.3**	181.2 ± 4.5**
Absolut (g)			
Liver	8.40 ± 0.62	3.61 ± 0.22**	12.81 ± 0.48**
Relative (g/100gBW)			
Liver	4.09 ± 0.12	2.43 ± 0.14**	7.07 ± 0.12**

<sup>a</sup>Mean ± SD

\*\* Significantly different from control group at p&lt;0.01.

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

Findings (±,+,++,+++)	Control	NNP	Quinoline
No. of animals	5	5	5
Karyomegaly,hepatocyte	0	5(0/1/4/0)	5(2/3/0/0)
Apoptosis,hepatocyte	0	5(0/5/0/0)	0
Vacuolar, hepatocyte, centrilobular	0	5(2/3/0/0)	0
Mitosis,hepatocyte	0	2(2/0/0/0)	0
Oval cell hyperplasia	0	5(0/0/5/0)	0
Bile duct proliferation	0	5(5/0/0/0)	0

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

Table 3 Overexpressed genes in the liver of F344 rats treated with acetamide, NNP and quinoline

GeneSymbol	Fold change		
	Acetamide vs Control (diet)	NNP vs Control (vehicle)	Quinoline vs Control (vehicle)
Stac3	6.4	1136.3	2.8
LOC367746	5.2	22.5	66.5
Inmt	4.8	321.6	81.8
Olr1352	4.5	5.0	2.2
Srms	3.5	9.2	3.3
Olr1353	3.4	12.8	4.0
Mmd2	3.3	26.6	11.7
Elapor1	3.1	8.8	3.0
Insig2	3.1	4.5	2.7
Srd5a1	3.1	8.7	2.4
Synrg	2.9	8.3	2.2
RGD1560510	3.1	7.0	2.2
Gimd1	3.0	11.1	5.8
LOC680406	2.9	215.2	2.1
LOC100362690	2.7	116.2	2.1
Il33	2.6	2.0	3.8
Aox3	2.4	351.5	2.1
Lhx8	2.4	51.9	3.3
Srd5a1	2.4	6.9	2.2
Lgsn	2.3	8.6	3.0
Tex12	2.3	6.0	5.8
Ncam2	2.3	2.1	4.7
Nox4	2.2	102.9	2.4
Apoa4	2.2	2.5	2.9
Tfap2b	2.2	2.4	4.0
Trhde	2.1	10.7	2.8
Oat	2.1	6.2	12.8
Hacl1	2.1	4.9	2.1
LOC688924	2.1	4.1	2.7
Ntrk1	2.1	3.3	2.3
Tmem79	2.1	3.2	2.2
Mtmr7	2.0	6.1	2.2
Cplx1	2.0	3.2	2.3
Wdr97	2.0	3.2	2.1



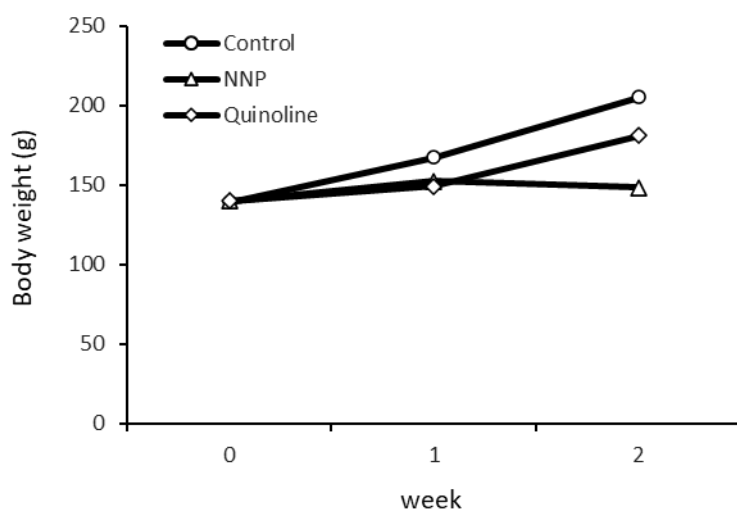


Figure 1. Mean body weight for F344 rats treated with NNP or quinoline for 2 weeks.

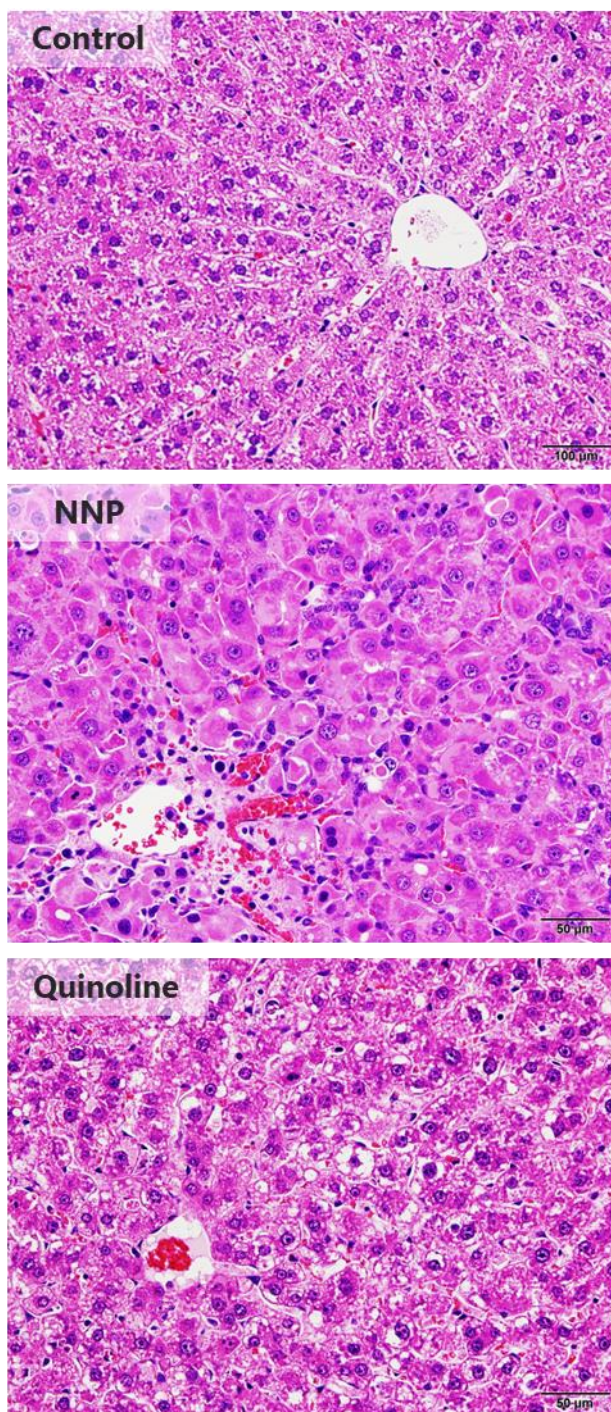


Figure 2. Histopathological changes in the livers of F344 rats treated with NNP and quinoline for 2 weeks.

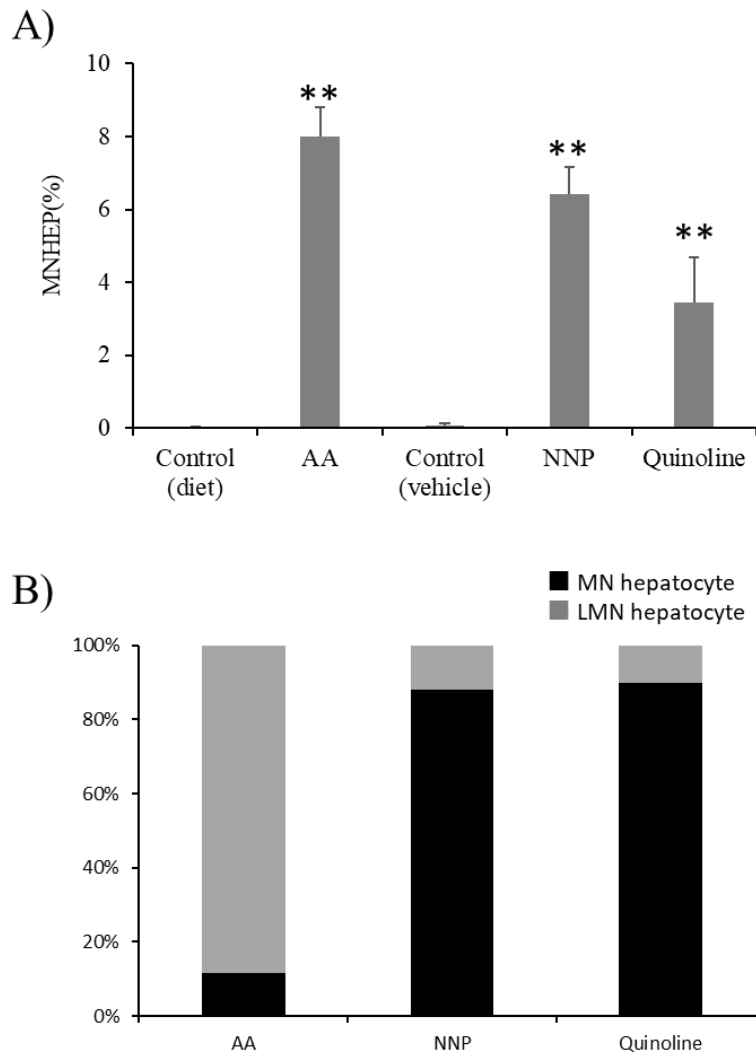


Figure 3. Liver micronucleus assay of F344 rats treated with AA, NNP or quinoline. (A) The quantification of ratio MNHEP/HEP. \*\*: Significantly different from the respective control groups at  $p < 0.01$ , respectively. (B) The ratio of MNHEP and LMNHEP hepatocyte detected in the AA, NNP or quinoline treated rats.

別添 4

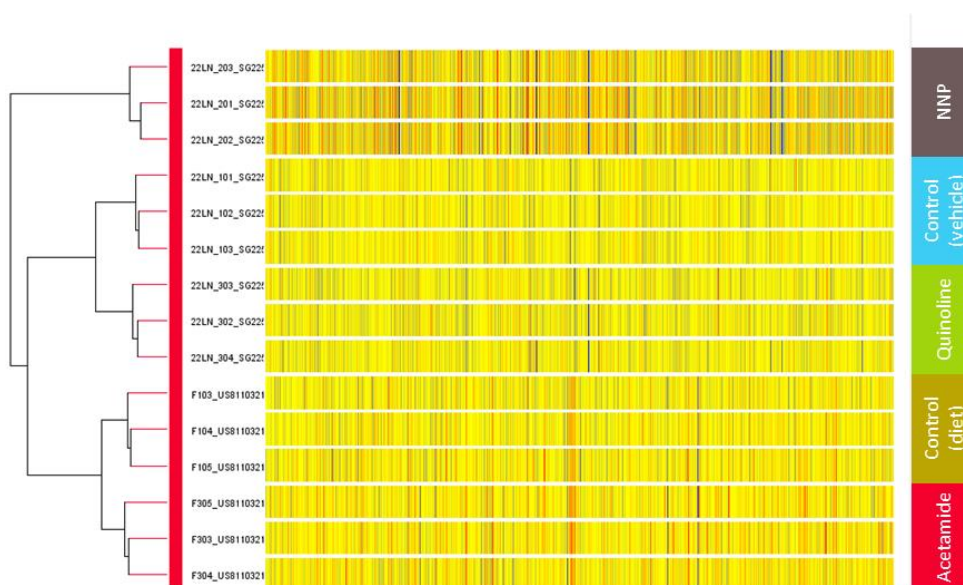
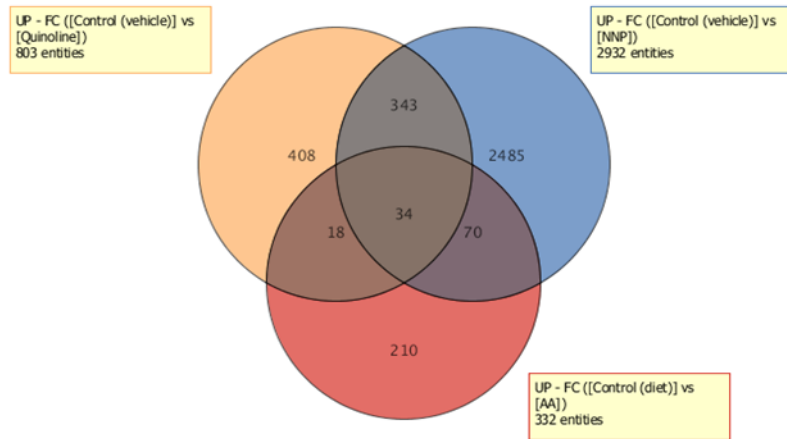


Figure 4. Cluster analysis of microarray data obtained from liver of F344 rats in the control and AA, NNP or quinoline-treated groups.

A)



B)

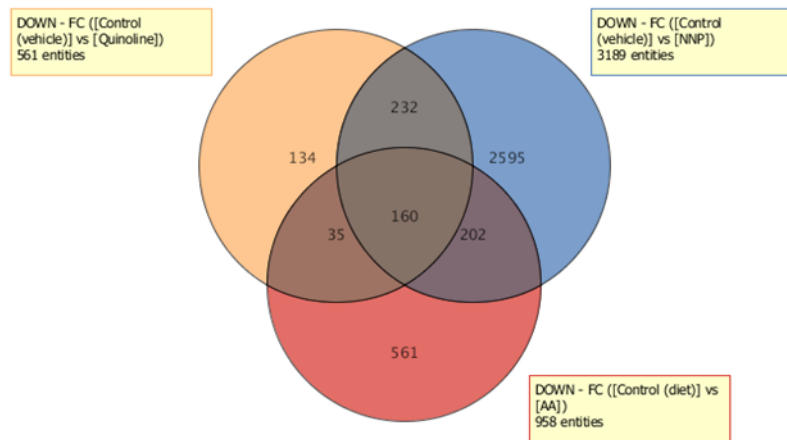


Figure 5. Ven diagrams of overexpressed gene (A) and underexpressed gene (B) in the liver of F344 rats treated with acetamide, NNP and quinoline.

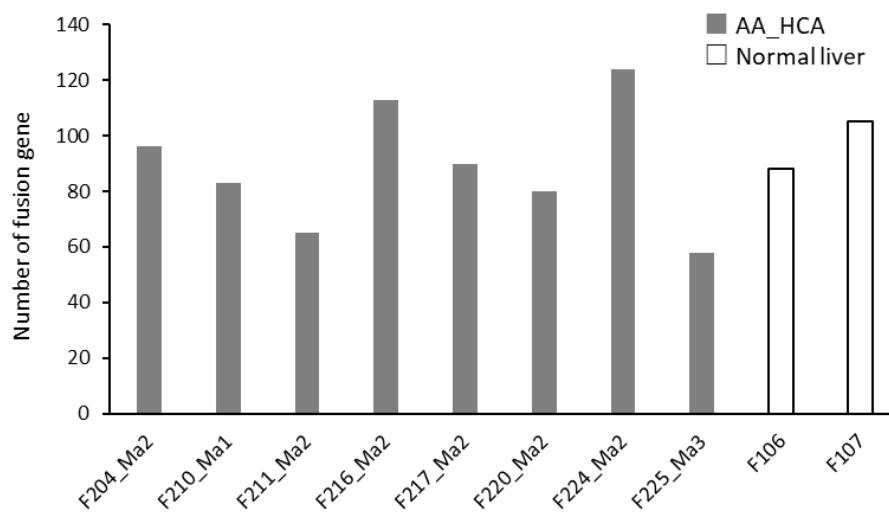


Figure 6. Number of fusion gene in the AA-induced HCA and normal liver tissue.

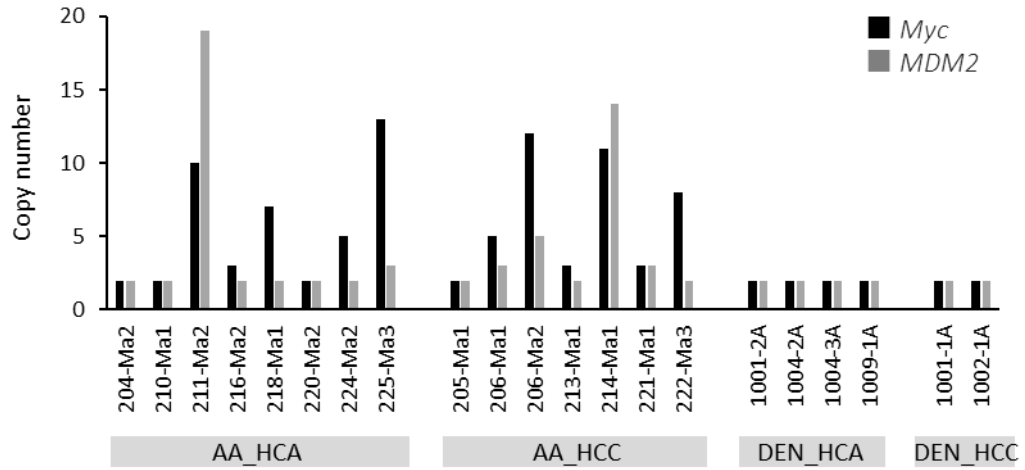


Figure 7. Copy number of *Myc* and *Mdm2* gene in the AA or DEN-induced HCA and HCC.

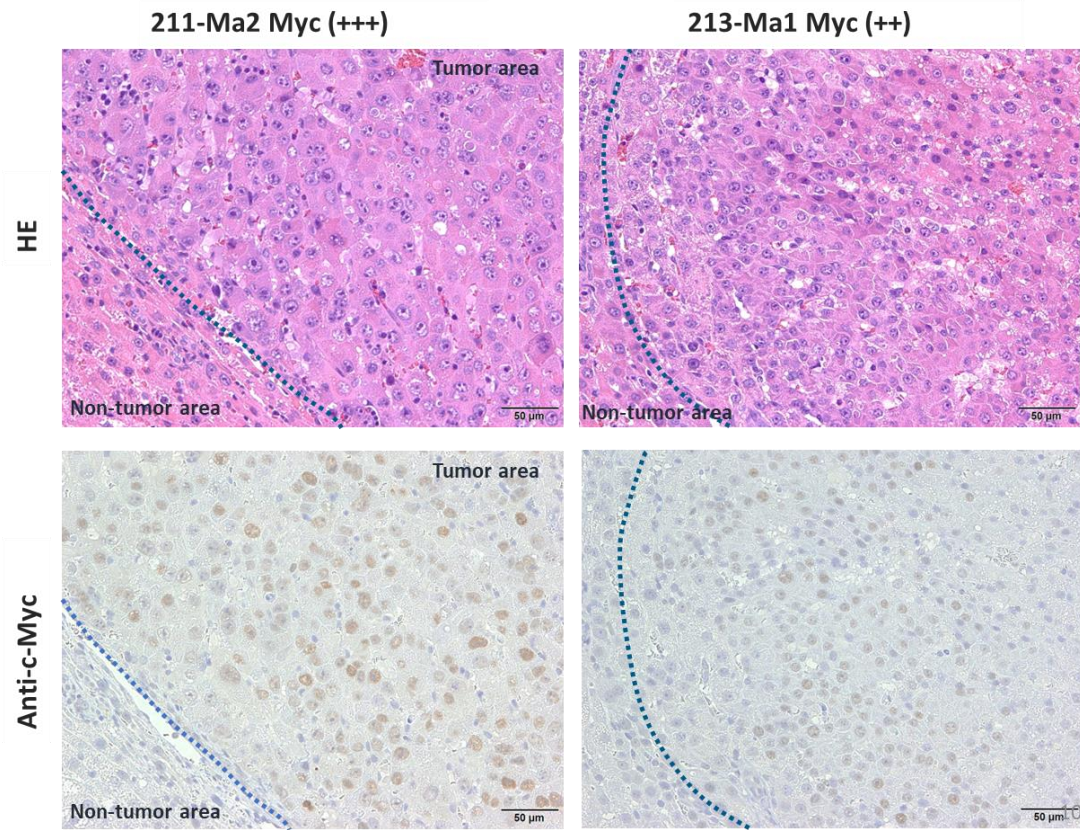


Figure 8. HE and Immunohistochemical stain with anti-c-Myc antibody, positive expression in tumor cells in the AA-induced HCA and HCC.



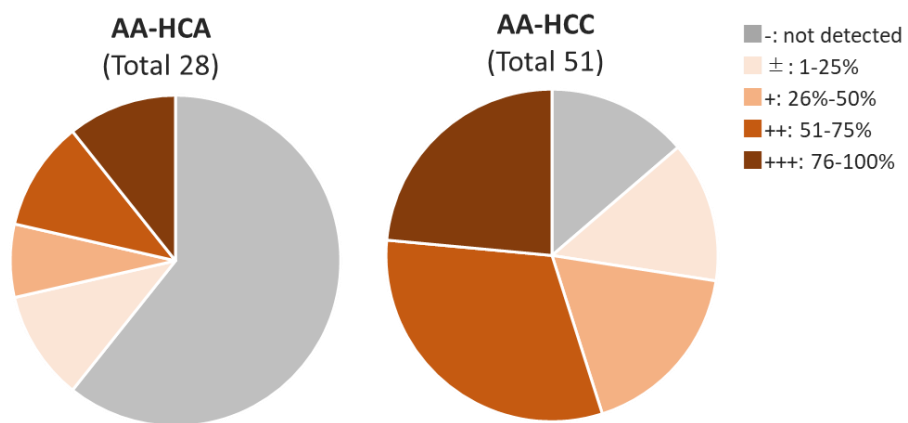


Figure 9. The ratio of c-Myc positive tumor in the AA-induced HCA and HCC.

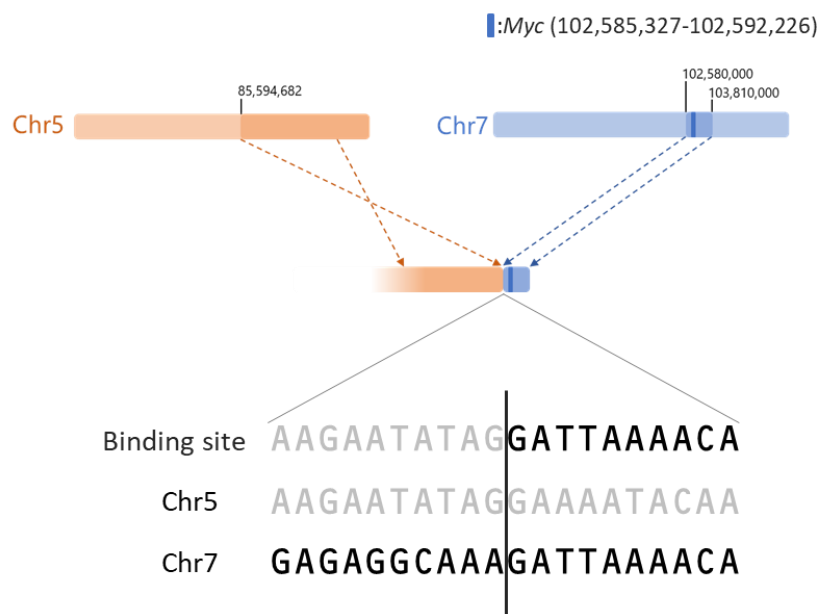


Figure 10. Binding site of *Myc* gene containing site of Chr 7 and Chr 5 observed in AA-induced HCA