

研究課題名：化審法における発がん性定量評価を見据えた新たな遺伝毒性評価技術
構築のための基盤研究

研究代表者： 杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）において、遺伝毒性試験の情報などから閾値なしと判断された優先評価化学物質のリスク評価を滞りなく進めるために、多数の労力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。それを踏まえ、「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」では、既存の*in vivo*小核試験やトランスジェニック動物遺伝子突然変異試験（TGR試験）と同じ試験対象物質の発がん性の定量指標であるTD₅₀値との相関性を調べ、TGR試験は全体的に*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、曝露手法が統一されていないことから、TD₅₀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。また、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、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その内容を踏まえて検討した結果、read acrossやグルーピングが、化審法で評価する毒性項目に適用できる方法であると考えられた。「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」については、*in vivo*遺伝毒性と発がん性の量的相関性を検討するため、TGR試験の用量反応データを用いて変異原性のpoint of departure (POD)を算出した。また、肝臓における変異原性POD (BMDL₅₀) と発がん性POD (TD₅₀またはBMDL₁₀) が概ね正の相関性を示すことなどを示した。「プロテオミクスデータを利用した*in vitro*遺伝毒性試験の精緻化に関する研究」については、Data Independent Acquisition (DIA) 法を遺伝毒性試験法に導入するため、まずヒトリンパ芽球細胞TK6株から同定数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。一度のプロテオミクス解析で安定して6000タンパク質数程度の同定と定量ができるプロトコルを確立できた。予備実験の結果、既知のH₂O₂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などが示唆された。「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」については、遺伝毒性評価と発がん性評価の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を究極の目標として、動物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。その結果、高濃度ホルムアルデヒド固定化におけるリンカーDNA切断の超音波処理条件を明らかにした。「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」については、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。肝臓小核誘発物質3剤をそれぞれ投与したラット肝臓での網羅的遺伝子発現

解析から、3剤に共通して発現増加する遺伝子34個を明らかにした。また、染色体不安定性による化学発がん機序として、acetamide (AA) 誘発肝腫瘍における原因遺伝子の探索を行い、Mycのコピー数増加がAAの肝腫瘍誘発過程における重要なイベントであることを明らかにした。

研究分担者

広瀬 明彦

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
安全性予測評価部・客員研究員

井上 薫

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
安全性予測評価部・室長

増村 健一

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
安全性予測評価部・部長

安井 学

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
変異遺伝部・室長

堀端 克良

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
変異遺伝部・室長

石井 雄二

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・室長

研究協力者

鈴木 孝昌

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子医薬部・室長

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。評価Iの段階で、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優先順位付けを行う事ができても、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。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。

一方、近年開発が進むAmes試験結果を*in silico*により予測するAmes/QSARは、医薬品中DNA反応性(変異原性)不純物の評価及び管理のガイドラインICH-M7でその活用が医薬品の不純物管理手法として既に実用化されているが、化審法では、新規化学物質の審査及び一般化学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データとしての取り扱いに留まる。

以上を踏まえて、分担課題「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」では、既知の遺伝毒性発がん物質等の公表データにお

る *in vivo* 遺伝毒性と発がん性の用量反応関係を解析すること、また、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にした。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。

分担課題「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」では、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した。特に、*in vivo* 遺伝毒性試験の用量反応データから遺伝毒性POD (Point of Departure) を算出し、発がん性PODとの相関性から、発がん性評価に資する遺伝毒性の量的評価指標について検討することを目的とした。

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明らかにしており、それを踏まえて、分担課題「プロテオミクスデータを利用した *in vitro* 遺伝毒性試験の精緻化に関する研究」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H₂O₂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Metascapeの濃縮分析を用いて、既知のH₂O₂の遺伝毒性スキームどおりの細胞応答を正確に反映しているかを調べた。

分担課題「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」については、*in vitro* 遺伝毒性試験結果から発がん性を定量的に予測するための基盤的な情報を得るため、遺伝毒性評価および発がん性評価に用いる研究材料・試験系等の統合を見据えた定量定性的な新規 *in vitro* / *in vivo* 遺伝毒性評価手法を開発することを目指し、その第一段階として、クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) をベースとした遺伝毒性活性検出法の最適化を行った。

近年、小核がchromothripsisと呼ばれる劇的な遺伝子変異を引き起こすことが明らかとなった。さらに、肝臓小核試験と肝発がん性には高い相関があることから、化学発がんの根底にも染色体不安定性が寄与すると考えられている。そこで分担課題「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」では、発がん性定量評価を見据えた新たな遺伝毒性評価技術として、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した。また、染色体不安定性が発がん性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目的に、肝臓小核誘発物質であるacetamide (AA) の肝腫瘍誘発過程におけるchromothripsisの関与について検討した。

B. 研究方法

「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」については、既存の定量的な *in vivo* 遺伝毒性試験データの検索として、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に収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。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Lhasa社のデータベースより得られたTD₅₀値との

相関性を解析した。加えて、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に、有害性評価における*in silico*評価手法の国内外での活用状況等を調査した。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。また、調査内容を踏まえ、化審法での人健康影響評価において活用可能な方法及び場面について検討した。

「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」については、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、過去に実施した肝発がん物質のTGR試験データを用いて、肝臓における突然変異体頻度の用量反応データからベンチマークドーズ(BMD)法により変異原性PODを算出した。肝発がん性はcarcinogenic potency database (CPDB)をもとにPODを算出した。International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT)において*in vivo*遺伝毒性試験の定量的評価に関する情報収集を行った。

「プロテオミクスデータを利用した*in vitro*遺伝毒性試験の精緻化に関する研究」については、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。H₂O₂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。H₂O₂処理濃度は、TK6細胞が24時間後に倍加できる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細胞ペレット(8 x 10⁵ cells)を用意した。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。濃縮分析については、フリーで利用可能なMetascapeウェブサイト (<https://metascape.org/>) を使用し、検索データベースはKEGG (京都大学)を使用した。

「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」については、ChIPをベースとした遺伝毒性活性検出法の最適化を行った。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が使用されるが、組織固定は一般的に3.7%ホルムアルデヒドが使用されるため、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。

「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」については、肝臓小核誘発物質であるAA、N-nitrosopropylamine (NNP) 又はquinolineをそれぞれ投与した雄性F344ラットの肝臓について、肝臓小核試験及び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剤に共通して発現する遺伝子を抽出した。染色体不安定性による化学発がん機序の検討では、AA誘発肝腫瘍における融合遺伝子解析、主要がん遺伝子のコピー数変異解析を実施した。コピー数増加がみられたがん遺伝子について免疫組織化学染色法によるタンパクの検出と遺伝子の挿入部位解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、所属機関における「動物実験の適正な実施に関する規定」、わが国における「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」ならびに厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して行った。加えて、試験

実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護を配慮の上で実施した。

C. 研究結果

「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」については、文献検索で得られた*in vivo*小核試験で得られた小核誘発率を用いた解析では、十分なデータ数が得られなかったが、NTP試験の中で行われた*in vivo*小核試験のデータとTD₅₀の解析では良好な相関関係が得られることが示された。一方トランジェニック遺伝毒性試験の突然変異頻度 (MF) とTD₅₀値の相関性解析も試行的に行った結果は、全体的にR²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。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。また、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については、欧州REACH規則では、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に、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が新規化学物質の審査にQSAR/read-acrossを活用した評価を行っており、New Approach Methodologies (NAM) の導入等により、2035年までに動物試験を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。

「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」については、変異原性POD算出の際、BMD法における基準となるcritical effect size (CES) (背景値からの一定の反応の程度) として0.5 (陰性対照値と比べて50%増加) を用いた。発がん標的臓器の肝臓において変異原性POD (BMDL50) と発がん性POD (TD50またはBMDL10) は概ね正の相関を示した。変異原性BMDL50 (mg/kg/day) を係数10~100で除するとTD50値を下回る傾向が見られた。2022年8月のIWGT会議では、遺伝毒性PODの算出にBMD法が有効とのコンセンサスが得られた。

「プロテオミクスデータを利用した*in vitro*遺伝毒性試験の精緻化に関する研究」では、プロテオミクス前処理方法、およびC18カラムの選定、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結果、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条件を見つけた。遺伝毒性プロテオミクスおよび濃縮分析は、既知のH₂O₂遺伝毒性スキームどおりに、短い処理時間において、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。

「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」については、マイクロチューブ型超音波処理システムにおいて125 cycleまでの超音波処理によりリンカーDNAの切断を実施した場合、1%ホルムアルデヒドで固定化した293細胞では45 cycleが最適であり、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ChIPに最適とされるDNA、すなわち、高分子DNAが完全に消失しかつ十分な量の500~100 bp DNA画分、が得られることを明らかにした。

「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」について、AA、NNP又はquinolineを投与したラットの肝臓において小核を有する肝細胞が増加することを

確認した。肝臓のマイクロアレイ解析の結果、3剤に共通して発現増加する遺伝子34個を明らかにした。染色体不安定性による化学発がん機序の検討では、融合遺伝子の発現は確認されなかったものの、腫瘍ではMyc及びMdm2のコピー数の増加が確認され、c-Mycタンパクの発現はhepatocellular carcinomaの86.3%が陽性を示した。さらに、HCA 1例について、Myc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ること明らかにした。

D. 考察

「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」については、予測式から得られる*in vivo*小核誘発率からのTD₅₀予測直線から5倍程度以内の直線の中に多くの点が入入るということは、*in vivo*小核誘発率からこの予測式をもとに予測値を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。一方、トランジェニック遺伝毒性試験の突然変異頻度(MF)とTD₅₀値の相関性解析では、各論文の曝露条件は実験毎に異なっており、より最適な指標を求めめるために、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。また、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を調査した結果、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。ただし、類似性等を含め妥当性がある評価結果が少ない現状から考えると、容易に活用できる方法ではないと思われる。したがって、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。

「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」については、肝発がん物質の標的組織において、変異原性PODと発がん性PODには概ね正の相関がみられた。一方、試験データによってPODの値は大きく異なり、特に発がん性POD算出に使用する発がん試験データの違い(異なる実験、異なるがん種類のスコア)が不確実性要因となることが示唆された。試験データが限られる場合は適切なデータ選択が難しいことから、個別試験データからの精緻な計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。IWGT会議における、エンドポイントが異なる*in vivo*遺伝毒性試験についてBMD解析のCESとしていずれも0.5を用いることが妥当との提案は、量的評価を検討する上で重要と考えられた。

武田ら(Hirota et al., *Genes to cells* 27(5):331-344 (2022).)は、80 µM H₂O₂で30分処理したTK6細胞中のDNA損傷が、15分程度ですぐに修復されることを報告している。「プロテオミクスデータを利用した*in vitro*遺伝毒性試験の精緻化に関する研究」についての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。一方、H₂O₂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課題が見つかった。プロテオミクスデータの特長として、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。

「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」については、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。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画分となるようにリンカーDNAを切断した上で免疫沈降を実施する必要がある、この結果は別研究で示されているChIPによる遺伝毒性応答反応検出系と同等であった。また、3.7%ホルムアルデヒド固定化条件においても、マイクロチューブ型超音波処理システムの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。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。リンカーDNAの最適な切断条件を明らかにしたことから、今後は引き続き、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を用いた遺伝毒性反応解析を実施する。

「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」については、小核誘発機序が異なるAA、NNP及びquinoline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。これらの中には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、病理組織学的に小核を有する肝細胞の検出を試みる。染色体不安定性による化学発がん機序の検討では、AA誘発肝腫瘍において、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を明らかにし、それに伴うc-Mycの発現増加を高頻度に認めた。さらに、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。こ

れらの特徴は、発がん過程における染色体粉砕と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

「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」の既知の遺伝毒性発がん物質等の公表データにおける*in vivo*遺伝毒性と発がん性の用量反応関係を解析するパートでは、今年度は、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TD₅₀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*小核試験の小核誘発率とTD₅₀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。また、トランジェニック遺伝毒性試験の突然変異頻度(MF)とTD₅₀値との相関性の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TD₅₀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。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たパートについては、有害性評価における*in silico*評価手法の国内外での活用状況等を調査した結果、read acrossやグルーピングが、化審法で評価する毒性項目に適用できる方法であると考えられたため、今後は、化審法のスクリーニング評価対象物質の中からRead across及びグルーピングのケーススタディを実施し、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。

「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」については、*in vivo*遺伝毒性試験(TGR試験)と発がん性試験の量的比較を試みた。肝発がん物質の標的臓器において両者に概ね正の相関がみられた。試験データによってPOD(TD₅₀等)のばらつきが大きいことは、変異原性PODから発がん性PODへの換算を考える上で不

別添 3

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（陰性対照値と比べて50%増加）が提案された。

「プロテオミクスデータを利用した*in vitro*遺伝毒性試験の精緻化に関する研究」については、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。予備的に実施したH₂O₂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。

「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」については、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が、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。

「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」については、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染色体粉砕と再構成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, 2021
2. 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 MutaTM Mouse. *Fundamental Toxicol Sci* 2022 9:31-36.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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
7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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, 112851.
 11. 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.
 12. 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
 13. Murata Y, Natsume M, Takako I, Shigeta Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K., Sugiyama KI., Masumura K., Hirose A, Matsumoto M: In vivo mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver and lung. *Genes and Environment.* in press, 2023
- 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 (2022.6)
 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(2022.6)
 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(2022.6)
 4. 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. 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. 第49回日本毒性学会学術集会, 北海道 (2022.6)
 5. 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. 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. 第49回日本毒性学会学術集会, 北海道 (2022.6)
 6. 相馬明玲, 石黒聖奈, 日比大介, 高須伸二, 石井雄二, 梅村隆志. 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. 第49回日本毒性学会学術集会, 北海道 (2022.6)
 7. 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) (2022.8)
8. Matsumura S, Hirose T, Otsubo Y, Ikeda N, Yamane M, Suzuki T, Matsumura K, Sugiyama K.: Evaluation of the error-corrected sequencing-based mutagenicity assay using *gpt delta* mice. The 13th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) and the 53rd Annual Meeting of the Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS) (2022.8)
 9. Horibata K, Sugiyama KI. Detection of Genotoxic Reactions Through Directly Analyzing DNA Damage Responses on Chromatin Fraction. The 13th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) and the 53rd Annual Meeting of the Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS) (2022.8)
 10. 増村健一 : 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 *de novo* 突然変異の解析. 日本放射線影響学会第65回大会(2022.9)
 11. 石井雄二. 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. 第47回日本医用マススペクトル学会年会, Web (2022.9)
 12. Matsumoto M, Murata Y, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Umamo T, Hirose A : Derivation of a target value of 1,3-butadiene, a possible contaminant, in drinking water, ICT2022, (2022.9)
 13. 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)
 14. 増村健一, 橋本清弘 : 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)
 15. 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)
 16. 増村健一, 安東朋子, 石井雄二, 杉山圭一 : *gpt delta* 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)
 17. 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, Petr Grúz, 増村健一, 能美健彦, 杉山圭一, 本間正充 : DNA polymerase κ 不活性化マウスにおいて *mitomycin C* によって誘発される γ 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)
 18. 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, 鈴木孝昌, 増村健一, 杉山圭一 : Error-corrected sequencing (ECS) の有用性検証 (*gpt delta* 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)
 19. 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、広島市 (2022.11)
 20. 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、広島市 (2022.11)
 21. 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)
22. 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 source of etheno-DNA damage. 日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会 (2022.11)
23. 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. 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. 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会, 広島県 (2022.11)
24. 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. 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. 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会, 広島県 (2022.11)
25. 日比大介, 高須伸二, 石井雄二, 梅村隆志. 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. 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会, 広島県 (2022.11)
26. 石井雄二, 中村賢志, 高須伸二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 小川久美子. 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. 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会, 広島県 (2022.11)
27. 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. 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. 第 39 回日本毒性病理学会, 東京都 (2023.1)
28. 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. Acetamide 投与ラットの肝臓に生じる大型小核の形成機序. 第 39 回日本毒性病理学会, 東京都 (2023.1)
29. 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. *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験による 2-isopropyl-N-2,3-trimethyl buthylamide (ITB) の評価. 第 39 回日本毒性病理学会, 東京都 (2023.1)
30. 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. *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. 第 39 回日本毒性病理学会, 東京都 (2023.1)
31. Matsumura S, Otsubo Y, Hosoi S, Hirose T, Ikeda N, Yamane M, Suzuki T, Masumura K, Sugiyama K: Current status and expectation on error-corrected NGS technology. 45th Environmental Mutagen Society of India (EMSI) Annual Meeting and International Conference (2023.01)

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