

令和7年度 厚生労働科学研究費 補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
 分担研究課題名: 発がん性試験と遺伝毒性試験の相互相関性の相関解析

研究分担者: 魏 民

所属 大阪公立大学 大学院医学研究科・准教授

研究要旨

本分担研究では、遺伝毒性の無作用量がみられる低用量域における *in vivo* 変異原性と発がん性の用量相関関係に DNA 損傷応答（DNA damage response: DDR）が重要な影響を与えるとの仮説に基づき、既存の発がん性試験で得られたラット肝組織を活用して、発がん性指標と DDR 関連反応との相互相関性を検討した。令和7年度は、ヘテロサイクリックアミンである MeIQx および IQ、ならびにニトロソ化合物である DEN を投与したラット肝組織を用い、7 種類の DDR 関連タンパク質（ γ -H2AX、p21^{Waf1/Cip1}、MOK、APE1、HP1 α 、PHLDA3、MYBL1）について免疫組織化学的解析を行った。その結果、 γ -H2AX 陽性細胞は MeIQx、IQ および DEN の高用量群で認められたものの、陽性率は低く、低用量域における発がん初期の DDR 反応を定量的に評価する指標としては感度に限界があることが示唆された。また、 γ -H2AX 以外の DDR 関連タンパク質では明確な陽性像は得られなかった。これらの結果から、発がん初期における DDR 反応は、肝臓全体に均一に生じるのではなく、特定の細胞集団に局在して生じる可能性が考えられた。そこで、新たに DEN 誘発ラット肝発がん実験を実施し、前がん病変形成期である 12 週および腫瘍形成期である 20 週の肝組織を対象として single-nucleus RNA-seq（snRNA-seq）解析を行うことより、DDR 応答細胞集団の同定ならびに発がん性予測に有用な新規 DDR 関連遺伝子候補を進めた。12 週時点では DEN 用量依存的に GST-P 陽性細胞巢が認められ、10 ppm で前がん病変形成の立ち上がりが確認され、50 ppm では肝実質の大部分が GST-P 陽性を示した。さらに、12 週時点肝組織を用いた snRNA-seq 解析では、対照群と DEN 投与群との間で UMAP 上のクラスター分布に明らかな差異が認められた。DEN 投与群では、前がん病変関連マーカーである Gstp1 の発現を示す細胞集団が認められ、GST-P 陽性前がん病変に対応する細胞状態を単一核レベルで捉えられる可能性が示された。また、DDR 関連遺伝子群を統合した module score 解析により、DEN 応答性細胞集団における DDR 活性の上昇傾向が認められた。以上より、snRNA-seq 解析は、発がん初期における DDR 応答細胞集団の同定および発がん性予測に有用な新規 DDR 関連遺伝子候補の探索に有用である可能性が示された。今後、20 週時点の肝腫瘍の解析結果と統合し、発がん性の定量評価に資する新規 DDR マーカー候補の探索・検証を進める。

A. 研究目的

化学物質の定量的発がん性評価は、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）等における化学物質のリスク評価において、有害性評価値を導出するために重要である。通常、発がん性評価では、遺伝毒性試験の結果に基づいて変異原性の有無を判断し、さらに発がん性試験の結果を用いて発がんリスクの強さや用量反応性を評価する。しかし、実際には、遺伝毒性陽性と判断され発がん性の懸念があるにもかかわらず、長期発がん性試験などの定量評価に利用可能な情報が十分に得られていない化学物質も少なくない。このような場合、発がん性の有無や強さを科学的に判断することが困難となり、リスク評価上の大きな課題となる。

そのため、本研究班「定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究」では、従来の長期発がん性試験を補完し、より迅速かつ合理的に化学物質の発がん性を定量的に評価するため、ゲノム安全性の観点から新たな発がん性評価指標を探索・開発することを目的としている。特に、DNA 損傷応答（DNA damage response: DDR）、染色体不安定性、変異頻度、変異スペクトルなど、発がん過程の初期に生じるゲノム毒性関連反応を定量的に捉えることにより、発がん性試験結果との関連性を明らかにし、化学物質発がん性予測への応用可能性を検証することを目指している。

本分担研究では、この研究班全体の中で、既存の発がん性試験および遺伝毒性試験で得られた知見と、DDR 関連反応との相互相関性を明らかにする役割を担う。これまで

に実施してきた遺伝毒性肝発がん物質の低用量発がん性評価研究では、遺伝毒性物質であっても、DNA 付加体形成、DNA 損傷、DNA 修復、変異誘発、前がん病変形成および腫瘍形成の各段階で用量反応性が必ずしも同一ではないことが示されている。すなわち、非常に低用量域では DNA 付加体や DNA 損傷が生じて、DNA 修復機構や細胞周期制御などの生体防御応答により、変異誘発や前がん病変形成には直ちに結びつかない可能性がある。一方、DNA 損傷が修復能力や細胞応答の許容範囲を超える用量域では、変異頻度の上昇、前がん病変の増加、さらに腫瘍形成へ進展すると考えられる。

このような発がん過程において、DDR は DNA 損傷を感知し、DNA 修復、細胞周期停止、アポトーシス、細胞老化などを制御する中心的な応答である。そのため、DDR 関連分子や DDR 応答細胞集団を同定することは、単に DNA 損傷の存在を示すだけでなく、その損傷が生体内でどの程度発がん過程に結びつく可能性があるかを評価するうえで重要である。特に、低用量域において発がんリスクの立ち上がりを反映する DDR 指標を同定できれば、長期発がん性試験を補完する新たな定量的評価指標、さらには Point of Departure (POD) 設定に資する指標となる可能性がある。

そこで本研究では、既存の発がん性試験で得られたラット肝組織を活用し、前がん病変や腫瘍形成などの発がん性指標と DDR 関連分子との関連を明らかにするとともに、DDR 法等を適用して両者の定量的・定性的相関を検討することを目的とした。さらに、発がん性の定量評価に資する DDR 関連分子および DDR 応答細胞集団を探索・同定し、

DDR を指標とした発がん性定量評価に用いる新たな POD 設定方法の提案を目指した。

B. 研究方法

1. 既存ラット肝組織を用いた DDR 関連タンパク質の免疫組織化学的解析

これまでに実施した遺伝毒性肝発がん物質の 16 週間投与試験で得られたラット肝臓ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いた。対象物質は、ヘテロサイクリックアミンである MeIQx (2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline) および IQ (2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline)、ならびにニトロソ化合物である DEN (diethylnitrosamine) とした。解析対象には、F344 ラット、BigBlue ラットおよび *gpt* delta ラットを用いた既存試験由来の肝組織を含めた (表 1)。免疫組織化学的解析では、DDR 関連タンパク質として γ -H2AX、p21^{Waf1/Cip1}、MOK (MOK protein kinase)、APE1 (Apyrimidinic Endonuclease 1)、HP1 α (Heterochromatin Protein 1 alpha)、PHLDA3 (Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 3) および MYBL1 (MYB proto-oncogene like 1) の 7 分子を検討した。これらはいずれも、既報の遺伝子発現解析において遺伝毒性肝発がん性の予測に有用な mRNA マーカー候補として抽出された分子であり、タンパク質レベルでの可視化マーカーとしての適用可能性を検討した。

2. DEN 誘発ラット肝発がんモデルを用いた snRNA-seq 解析

免疫組織化学的解析では、検討した DDR 関連タンパク質について、低用量域におけ

る DDR 反応の検出感度に限界がある可能性が示された。そのため、新たに DEN 誘発ラット肝発がん実験を実施し、より高感度に遺伝毒性および発がん性の予測に有用な新規 DDR 関連遺伝子候補の同定を試みた。

6 週齢雄性 F344 ラットに DEN を 0 (対照群)、1、10 および 50 ppm の 4 用量で飲水投与し、12 週を発がん早期 (前がん病変形成期)、20 週を腫瘍形成期として肝組織および肝腫瘍を採取する計画とした。各時点の肝組織および肝腫瘍を対象に、single-nucleus RNA-seq (snRNA-seq) 解析を実施し、DEN 応答性の高い DDR 関連遺伝子を発現する肝細胞集団を同定するとともに、新規 DDR マーカー候補を探索することとした。また、本研究で得られた肝組織、肝腫瘍および snRNA-seq 解析データは、研究班全体における新規 DDR 評価法の適用検証にも活用可能であり、必要に応じて各分担研究班へ材料を提供するとともに、各分担研究班で開発された新規 DDR 関連分子の有用性検証にも協力する計画である。

12 週時点の肝組織については、前がん病変マーカーである glutathione S-transferase placental form (GST-P) 免疫染色を実施し、DEN 投与による前がん病変形成の用量反応性を評価した。さらに、前がん病変形成の立ち上がり用量および DDR 応答細胞集団の解析に適した高用量条件を確認した。

3. DEN 誘発ラット肝発がんモデルを用いた single-nucleus RNA sequencing 解析

DEN 誘発ラット肝発がんモデルにおける DDR 関連細胞集団および新規 DDR マーカー候補を探索するため、snRNA-seq 解析を実

施した。本年度は、無処置群（対照群）および 50 ppm DEN の 12 週投与後の肝組織を対象として解析を行った。

採取した肝組織から単離核懸濁液を調製し、BD Rhapsody システムを用いて核および barcoded beads をロードした。各核由来 mRNA を barcoded beads に捕捉し、逆転写により cDNA を合成した後、whole transcriptome amplification (WTA) により増幅した。増幅産物はビーズ精製によるサイズセクションを行い、MultiNA システムを用いてライブラリのサイズ分布を確認した。続いて、NEBNext Ultra II FS Library Prep Kit を用いて DNA 断片化およびアダプター・バーコード付加を行い、MGIEasy Universal Library Conversion Kit による conversion および circularization を経て DNB を作製し、DNBSEQ-T7 によりシーケンスを実施した。

取得した fastq データは、Cutadapt によりアダプタートリミング、ホモポリマートリミングおよびクオリティフィルタリングを行った後、STARsolo version 2.7.10b を用いてラット参照ゲノム mRatBN7.2_107_nosmRNA へマッピングした。遺伝子 symbol ごとに各核の遺伝子発現カウントテーブルを作成し、R の DropletUtils package および Dropkick package を用いて低品質バーコードおよび background を除外した。Tag 情報に基づく demultiplex 解析により各検体由来の核を識別し、得られた発現マトリックスを用いて RStudio にて DEN 応答性細胞集団および DDR 関連遺伝子発現の解析を行った。

（倫理面の配慮）

動物を用いた実験は、大阪公立大学にお

ける「動物実験の適正な実施に関する規定」ならびにわが国における「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」に準拠して行った。加えて、大阪公立大学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

1. DDR 関連タンパク質の免疫組織化学的解析

MeIQx、IQ および DEN を投与した既存ラット肝組織を用いて、7 種類の DDR 関連タンパク質の発現を免疫組織化学的に検討した（図 1）。その結果、 γ -H2AX 陽性細胞は、MeIQx 100 ppm 群、IQ 100 ppm 群および DEN 10 ppm 群などの高用量群において認められた。一方で、いずれの物質においても γ -H2AX 陽性率は低く、低用量域における DDR 反応を定量的に評価するには十分な感度が得られない可能性が示された。 γ -H2AX 以外の 6 分子（p21^{Waf1/Cip1}、MOK、APE1、HP1 α 、PHLDA3、MYBL1）については、本研究の検討条件下では明確な陽性像は得られなかった。したがって、これらの分子は mRNA レベルでは遺伝毒性肝発がん性の予測マーカーとして有用性が示唆されるものの、免疫組織化学的手法によるタンパク質発現の可視化マーカーとしては、少なくとも本検討条件では発がん初期の DDR 反応を捉える感度に限界があると考えられた。

2. DEN 誘発ラット肝発がんモデルの 12 週時点における病理学的評価

DEN 誘発ラット肝発がんモデルでは、12 週時点において 0 ppm、1 ppm および 10 ppm 群では肉眼的に明らかな異常所見は認められなかった。一方、50 ppm 群では肝臓に多

数の結節が認められた (図 2A)。

GST-P 免疫染色では、DEN 投与量に依存して GST-P 陽性細胞巢が増加した (図 2B)。1 ppm 群では対照群と比較して明確な差は認められず、散発的な単細胞陽性が主体であった。10 ppm 群では 10 細胞以上からなる GST-P 陽性細胞巢が出現し、前がん病変形成の立ち上がり用量に相当すると考えられた。50 ppm 群では肝実質の 80%以上が GST-P 陽性を示し、前がん病変に由来する細胞状態を高頻度に回収できることから、DDR 応答細胞集団の同定を目的とした snRNA-seq 解析に適した条件であると考えられた。

3. DEN 誘発ラット肝発がんモデルにおける snRNA-seq 解析

DEN 誘発ラット肝発がんモデルの 12 週時点肝組織を用いて、snRNA-seq 解析を実施した。解析対象は、対照群由来 3 サンプルおよび 50 ppm DEN 投与群由来 3 サンプルであった。全サンプルを統合して UMAP 解析を行ったところ、対照群由来サンプルと DEN 投与群由来サンプルの間で明らかなクラスター分布の差異が認められた。特に、DEN 投与群では対照群と比較して特定のクラスターが増加または新たに出現しており、DEN 曝露に伴う肝細胞状態の変化を反映していると考えられた。現時点の解析では、DEN 投与に関連するクラスターとして、Cluster 3、7、8、11、14、17、25、および Cluster 0、12、27 が抽出された (図 3)。

次に、各クラスターのマーカー遺伝子発現に基づき、細胞集団のアノテーションを行った。その結果、主要な細胞集団として、正常肝細胞集団、DEN 応答性肝細胞集団、

DEN 応答性前駆細胞様集団、内皮細胞集団、胆管細胞様集団、免疫細胞集団および星細胞集団が同定された。DEN 投与群では、Gstp1 をはじめとする前がん病変関連マーカーの発現を示す細胞集団が認められ、GST-P 陽性前がん病変に対応する細胞状態を snRNA-seq 上で捉えられる可能性が示された (図 4)。

さらに、Seurat の AddModuleScore を用いて DDR 関連遺伝子群を統合した DDR module score を算出したところ、DEN 応答性細胞集団、特に DEN 応答性前駆細胞様集団および一部の DEN 応答性肝細胞集団において DDR 活性の上昇傾向が認められた (図 5)。

また、Gstp1 を前がん病変関連細胞集団の指標、増殖関連遺伝子群を細胞増殖活性の指標、DDR 関連遺伝子群を DNA 損傷応答の指標として予備的に評価した。その結果、DEN 応答性前駆細胞様集団では、GST-P 陽性前がん病変に関連する分子プロファイルに加え、増殖関連および DDR 関連スコアが相対的に高い傾向を示した。

D. 考察

本研究では、既存の遺伝毒性肝発がん物質投与試験由来のラット肝組織を用い、DDR 関連タンパク質の免疫組織化学的解析を行った。その結果、 γ -H2AX 陽性細胞は高用量群で認められたものの、陽性率は低く、低用量域における DDR 反応を定量的に捉えるには感度が十分でない可能性が示された。

今回検討した DDR 関連分子の多くは、これまでの mRNA 発現解析により遺伝毒性肝発がん性の予測に有用な候補として同定さ

れたものである。したがって、mRNA レベルでは発がん関連応答を高感度に反映する可能性がある一方で、タンパク質レベルでの発現量、抗体の特異性、細胞内局在、陽性細胞の頻度、FFPE 標本における抗原性保持などの要因により、免疫組織化学的検出では十分なシグナルが得られない可能性が考えられた。一方、 γ -H2AX 陽性細胞が高用量群に局限して散発的に認められたことは、発がん初期における DDR 反応が肝臓全体に均一に生じるのではなく、特定の少数細胞集団に局在して生じる可能性を示唆している。このことは、既知の DDR 関連タンパク質の免疫組織化学的解析のみでは、発がん初期の DDR 反応を定量的に捉えることが困難であることを示しており、細胞集団を分解して解析可能な snRNA-seq 解析を実施する根拠となった。

DEN 誘発ラット肝発がんモデルの 12 週時点の病理学的解析では、GST-P 陽性細胞巢が DEN 用量依存的に形成され、10 ppm で前がん病変形成の立ち上がりが確認された。また、50 ppm 群では肝実質の大部分が GST-P 陽性を示したことから、前がん病変に関連する細胞状態を効率よく捕捉し、DDR 応答細胞集団を探索するための解析条件として有用であると考えられる。

12 週時点サンプルを対象とした snRNA-seq 解析では、対照群と DEN 投与群の間で UMAP 上のクラスター分布に明らかな差異が認められ、DEN 投与に関連する複数の細胞集団が同定された。特に、Gstp1 をはじめとする前がん病変関連マーカーを発現する細胞集団が認められたことから、GST-P 陽性前がん病変に対応する細胞状態を単一核レベルで捉えられる可能性が示された。ま

た、DDR 関連遺伝子群を統合した module score 解析により、DEN 応答性細胞集団において DDR 活性の上昇傾向が認められたことから、snRNA-seq 解析は、発がん初期の DDR 応答細胞集団および発がん性予測に有用な新規 DDR 関連遺伝子候補を同定するための有効な手法であると考えられた。

さらに、DEN 投与に関連する特徴的な細胞集団のうち、GST-P 陽性前がん病変に対応すると考えられる前駆細胞様集団では、細胞増殖および DDR 関連応答の活性化傾向が認められた。このことは、DEN 誘発肝発がん早期における DDR 反応が、前がん病変形成に関わる特定の細胞集団に局在して生じる可能性を支持するものと考えられる。

今後、低用量、中用量および高用量の各群を比較することで、発がん性指標と DDR 関連遺伝子発現の用量反応性を統合的に評価できると期待される。また、12 週の前がん病変形成期サンプルと 20 週の腫瘍形成期サンプルを統合解析することにより、前がん病変から腫瘍形成に至る過程で維持または増強される DDR 関連細胞集団および遺伝子群を同定し、発がん性の定量評価に資する新規 DDR マーカー候補として検証する予定である。

さらに、本研究で得られた DEN 誘発ラット肝発がんモデルの肝組織、肝腫瘍および分子解析データは、研究班全体における DDR 法等の適用検証にも活用可能である。必要に応じて各分担研究班に材料を提供するとともに、各分担研究班で開発された新規 DDR 関連分子について、本モデルを用いた有用性検証を行うことで、研究班全体の新規発がん性定量評価手法の確立に貢献できると考えられる。

E. 結論

snRNA-seqを用いた細胞集団別解析は、発がん初期のDDR応答細胞集団の同定に有効であり、発がん性予測に資する新規DDR関連遺伝子候補の探索にも有用である可能性が示された。今後、12週および20週サンプルの統合解析と、研究班内で開発されるDDR関連分子の検証を通じて、定量的発がん性評価に資するDDRマーカー候補の確立を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Maeda-Tateishi, T, Nagata, Y, Imanishi, Y, Hirakawa, T, Tan, SS, Emoto, M, Gi, M. Evaluation of tumor clonality with chemical carcinogenesis in a mouse model of visualized X chromosome inactivation. *J Toxicol Pathol*. 2026; 39(1): 31-38.
2. Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Ogawa K, Gi M, Naiki-Ito A, Abdallah S, Tsuda H. Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment. *J Appl Toxicol*. 2026; 46(4): 1232-1245.
3. Vachiraarunwong A, Fujioka M, Alexander DB, Suzuki S, Guo R, Qiu G, Kawamura Y, Shibano K, Noura I, Praseatsook K, Akane H, Takasu S, Tsuda H, Ogawa K, Wanibuchi H, Gi M. Developing a novel in vitro toxicity assay for predicting inhalation toxicity in rats. *Toxicol Lett*. 2026; 415: 111803.
4. Gi M, Suzuki S, Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander WT, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Noura I, Kakehashi A, Xie XL, Tsuruoka S, Hirose A, Naiki-Ito A, Tsuda H, Wanibuchi H. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways. *Nanomaterials* (Basel). 2025; 15(23).
5. Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, Takase H, Taquahashi Y, Hojo M, Maeno A, Fukamachi K, Gi M, Hirose A, Tsuruoka S, Takahashi S, Tsuda H, Naiki-Ito A. Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs. *Nanomaterials* (Basel). 2025; 15(18).
6. Guo R, Gi M, Kiyono T, Vachiraarunwong A, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Praseatsook K, Kawamura Y, Kakehashi A, Noura I, Xie X, Wanibuchi H. Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in

- Toxicity Assessment of Arsenicals. *Toxics*. 2025; 13(10).
7. Turner MC, Godderis L, Guenel P, Hopf N, Quintanilla-Vega B, Soares-Lima SC, Chaiklieng S, Da Silva J, Fustinoni S, Gi M, Heck JE, Huaux F, Johanson G, Kirkeleit J, Kirsanov K, Richiardi L, Teixeira JP, Terron A, Topinka J, White MC, Benbrahim-Tallaa L, Facchin C, Kunzmann A, Madia F, Pasqual E, Wedekind R, Deng X, Suonio E, Viegas S, Barry A, Dolatkhan R, Dongoran RA, Gonzalez-Gil EM, Onyije FM, Mattock H, de Conti A, Schubauer-Berigan MK. Carcinogenicity of automotive gasoline and some oxygenated gasoline additives. *Lancet Oncol*. 2025; 26 (5): 548-549.
8. Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38(1): 59-67.
9. Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Taya S, Setthaya P, Sato K, Wanibuchi H, Wongpoomchai R, Dejkriengkraikul P, Gi M, Yodkeree S. Anticancer and Antioxidant Effects of Bioactive Peptides from Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*). *Nutrients*. 2025; 17(4).
10. Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Sato K, Dissook S, Wanibuchi H, Taya S, Wongpoomchai R, Dejkriengkraikul P, Gi M, Yodkeree S. Chemopreventive Effects of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae Protein Hydrolysates in a Rat Model of Early-Stage Colorectal Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2025; 26(13).
11. Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38(2): 147-154.
12. Nakano M, Gi M, Toyooka T, Suzuki S, Wanibuchi H, Takebayashi T. Occupational health topics series on the effects of chemicals: epidemiological and toxicological risk assessments of ortho-toluidine for bladder cancer. *J Occup Health*. 2025; 67(1).
13. Kakehashi A, Suzuki S, Nishidoi Y, Hagihara A, Ikenaga H, Shiota M, Qiu G, Noura I, Kuwae Y, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Gi M, Kawada N, Wanibuchi H. The Impact of Peroxiredoxin 3 on Molecular Testing, Diagnosis, and Prognosis in Human Pancreatic Ductal

Adenocarcinoma. *Cancers* (Basel). 2025; 17(13).

14. Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38(2): 161-165.

G.2 学会発表

1. Arpamas Vachiraarunwong, 魏民, 藤岡正喜, 鈴木周五, 邱桂鈺, 郭潤傑, 野浦郁恵, 梯アンナ, Kwanchanok Praseatsook, 鰐淵英機. ラットの急性吸入毒性を予測する新規 *in vitro* 毒性試験系の開発. 第 52 回日本毒性学会学術年会, 沖縄 (2025. 7)
2. Arpamas Vachiraarunwong, Kwanchanok Praseatsook, Rapiwan Wongpoomchai, Shugo Suzuki, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi, Supachai Yodkeree, Min Gi. Chemopreventive Potential of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae. がん予防学術大会 2025, 名古屋 (2025. 9)
3. 郭潤傑, Arpamas Vachiraarunwong, 鈴木周五, 藤岡正喜, Guiyu Qiu, 河村百合菜, 梯アンナ, 鰐淵英機, 魏民. DMH 投与ラットにおける大腸発がん初期の遺伝子発現変動. 第 84 回日本癌学会学術総会, 石川 (2025. 9)
4. Arpamas Vachiraarunwong, Shugo

Suzuki, Masaki Fujioka, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Kawamura Yurina, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Structure-Dependent Hepatotoxicity and Carcinogenic Potential of PFASs in Immortalized Human Liver Cells. 第 84 回日本癌学会学術総会, 石川 (2025. 9)

5. 邱桂鈺, 魏民, 鈴木周五, 藤岡正喜, 梯アンナ, ワシラアルンウオン アルパマス, 野浦郁恵, 郭潤傑, 鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露によるラット海馬に及ぼす影響. メタルバイオサイエンス研究会 2025, 東京 (2025. 9)
6. 鈴木周五, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 鰐淵英機. 動物モデルを用いた職業性膀胱がんの研究について. 第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 大阪 (2025. 10)
7. 藤岡正喜, 鈴木周五, 魏民, Vachiraarunwong Arpamas, 野浦郁恵, 邱桂鈺, 河村百合菜, 大石裕司, 山口貴嗣, 鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸の経胎盤ばく露による次世代雄性マウスにおける肝発がん機序の検討. 第 30 回ヒ素シンポジウム, 大阪 (2025. 12)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

別添 4

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

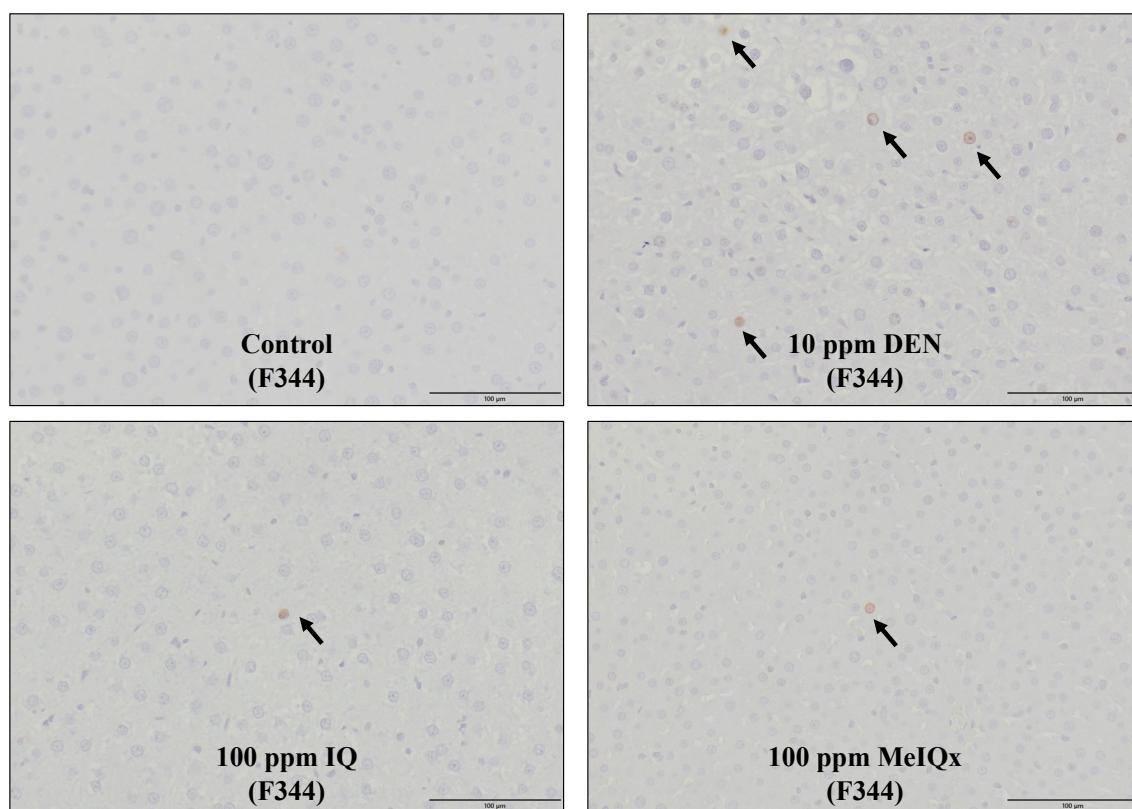
なし

3. その他

なし

表 1 DDR 関連タンパク質の免疫組織化学的解析に用いた遺伝毒性肝発がん物質投与ラット肝組織

被験物質	ラット	投与期間 (投与経路)	用量
DEN	雄性 F344	16 週 (飲水)	0, 0.0001, 0.001, 0.1, 1, 10 ppm
DEN	雄性 BigBlue	16 週 (飲水)	0, 0.0001, 0.001, 0.1, 1 ppm
IQ	雄性 F344	16 週 (混餌)	0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ppm
IQ	雄性 <i>gpt delta</i>	4 週 (混餌)	0, 0.1, 1, 10, 100 ppm
MeIQx	雄性 F344	16 週 (混餌)	0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ppm
MeIQx	雄性 BigBlue	16 週 (混餌)	0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ppm

図 1 遺伝毒性肝発がん物質投与ラット肝臓における γ -H2AX 発現

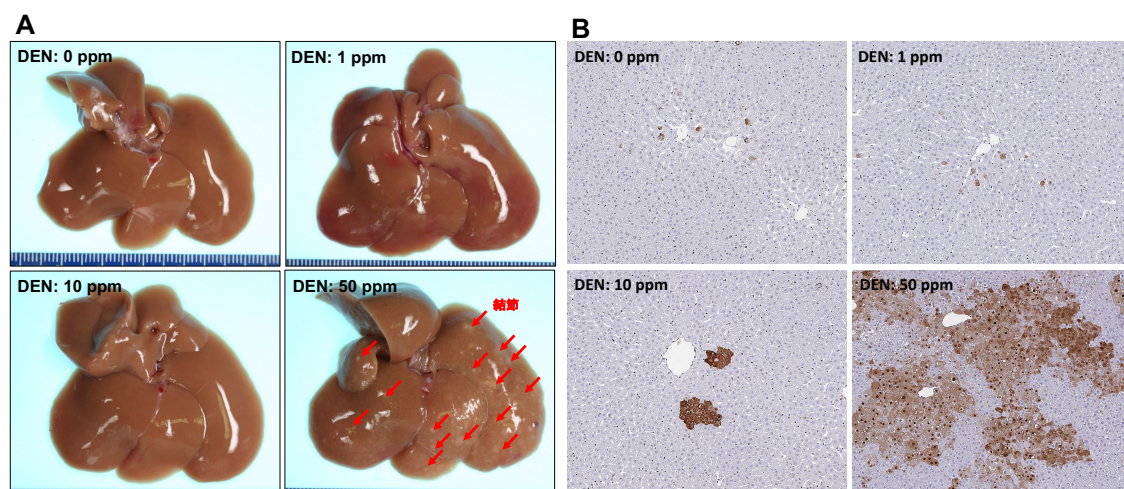


図2 DEN 投与 12 週時点におけるラット肝臓の肉眼像および GST-P 陽性細胞巣

A : DEN 投与 12 週時点の肝臓肉眼像。 B : GST-P 免疫染色像。

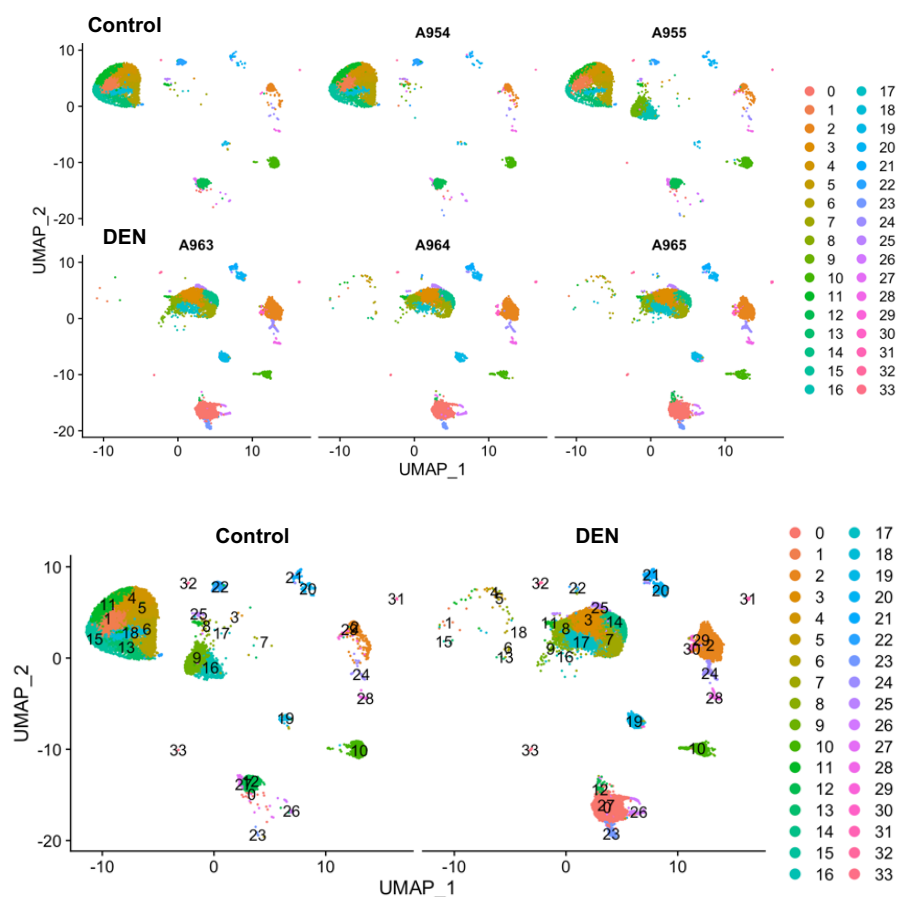


図3 DEN 誘発ラット肝発がんモデルにおける snRNA-seq 解析 : UMAP による DEN 投与関連クラスタの抽出

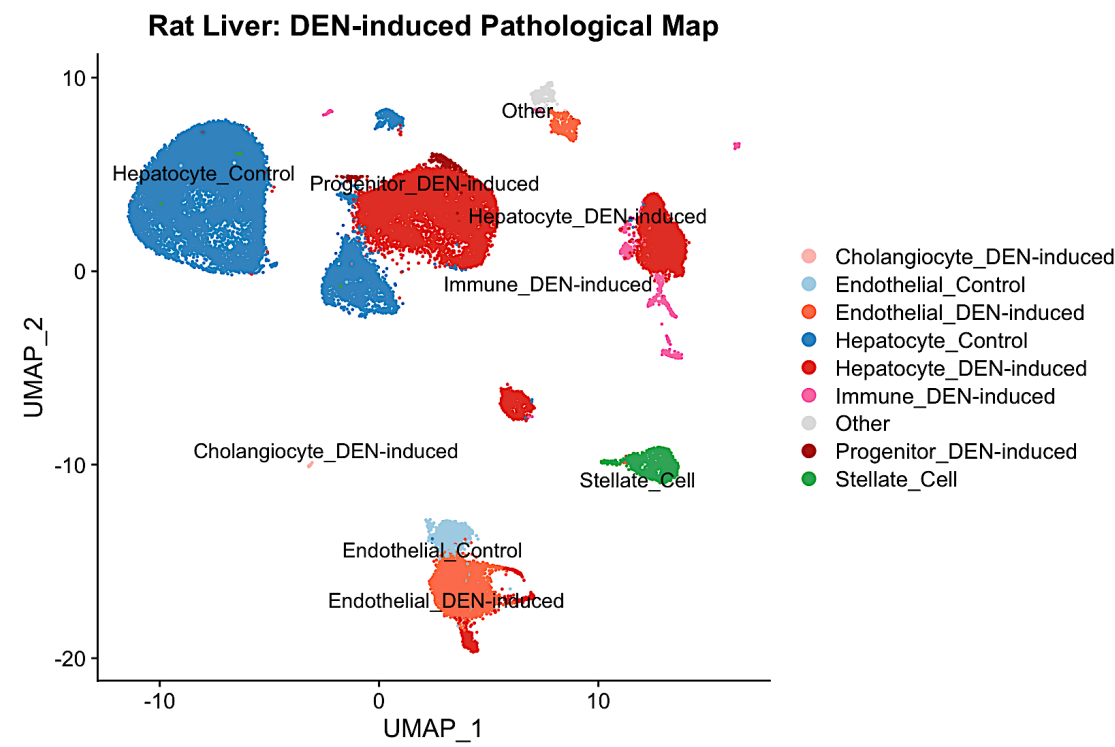


図 4 snRNA-seq 解析による DEN 応答性細胞集団の同定

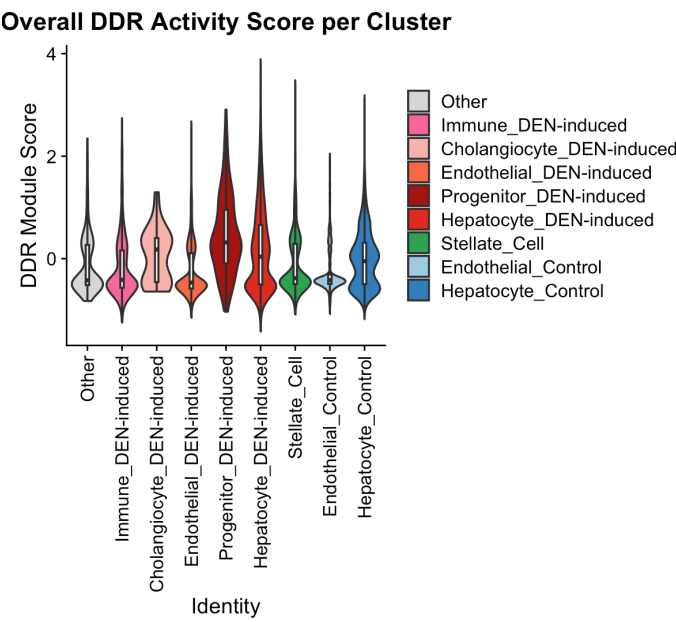


図 5 DEN 応答性細胞集団における DDR module score 解析