

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）
総括研究報告書

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

研究代表者：堀端克良

国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部

研究要旨

本研究では、発がん性定量的評価に資する情報がない化学物質の評価を迅速かつ効率的に進めるため、発がん性定量評価を可能とするような新しい指標をゲノム安全性の観点から見出し、それらを活用した評価手法を開発するとともに、新手法と既存の発がん性試験結果等との定量定性的な相関性を明らかにすることで定量的化学物質発がん性予測への適用性を検証する。そのため、本研究班では以下の分担項目に基づいて研究を進めた。分担研究項目「化学物質の人健康に関する有害性評価における定量的発がん性評価の現状・課題の整理と各種新規解析手法の活用場面の検討」については、現時点までに、化審法のためのリスク評価における発がん性の定量的評価の現状と課題を整理し、変異原性の有無に関する判断及び発がん性の定量的評価における 2 つの課題を確認した。分担研究項目「DNA 損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法（DDR 法）の開発」については、クロマチン免疫沈降法などの分子生物学的な手法で化学物質等により誘発される DNA 損傷応答反応の検出に取り組むとともに、クロマチン定量プロテオミクス法の前処理法を改良し、TK6(IVGT)細胞のエトポシド曝露により 5 種 DNA 損傷応答・修復タンパク質のクロマチン結合増加を検出した。本手法は発がん関連応答を捉える評価系として有用であることを示した。分担研究項目「第Ⅱ相薬物代謝も勘案した *in vitro* 小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究」については、ラット肝 S9 存在下でアリストロキア酸 I の *in vitro* 小核試験を実施した結果、PAPS 補充群は、非補充群よりも小核細胞の割合が統計的有意に増加した。しかし、それは十分な増加とは言えず引き続き陽性対照物質の探索を行う。分担研究項目「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、種々の遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質を用いて、抗 γ H2AX 抗体を用いた病理組織学的小核試験の有用性を検討した。分担研究項目「ecNGS 法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」については、ecNGS 法の用量反応性に関するデータを取得したほか、キノリン曝露ラット肝臓 FFPE を入手して次年度の検証準備を完了した。また、PacBio 社 Revio の HIFI リードや他社ショートリード機種 of PECC-seq への応用も検討した。分担研究項目「発がん性試験と遺伝毒性試験や DNA 損傷応答反応等との相互相関性解析と DDR 法等の適用検証」については、ヘテロサイクリックアミンおよびニトロソ化合物の 16 週間投与試験で得られたラット肝組織を用いて、7 種類の DDR 関連タンパク質を免疫組織化学的に解析した。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、発がん初期の DNA 損傷応答を定量的評価指標として用いるには感度面で課題があることが示唆された。このため、DEN 誘発ラット肝発がんモデルを用いた snRNA-seq 解析を実施し、発がん過程における DDR 応答細胞集団の同定を進めている。12 週時点では、DEN 用量依存的な GST-P 陽性細胞巢の形成を確認し、snRNA-seq 解析により DEN 投与に伴い変動する細胞集団を抽出した。さらに、Gstp1 陽性前がん病変関連細胞集団および DDR 活性の上昇傾向を示す DEN 応答性細胞集団を同定した。20 週投与試験も終了しており、現在、肝腫瘍を対象とした解析に向けた準備を進めるとともに、前がん病変形成期から腫瘍形成期に至る DDR 関連細胞集団の推移を検討する予定である。

研究分担者

杉山圭一：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 ゲノム安全科学部・部長

鈴木孝昌：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 ゲノム安全科学部・主任研究官

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ゲノム安全科学部・室長

諸角涼介：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ゲノム安全科学部・任期付研究員

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

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

松田俊：京都大学大学院工学研究科・准教授

魏民：大阪公立大学大学院医学研究科・准教授

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）等の化学物質安全対策行政上の種々のリスク評価において必要であり、遺伝毒性の定性的評価結果と発がん性試験結果に基づき有害性評価値を導出する。しかし、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、発がん性定量的評価に資する情報がない化学物質については、発がん性定量的評価を行うことができない。これらの評価を迅速かつ効率的に進めるために、多大

な労力等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。本研究班では、発がん性定量評価を可能とするような新しい指標をゲノム安全性の観点から見出し、それらを活用した評価手法を開発するとともに、新手法と既存の発がん性試験結果等との定量定性的な相関性を明らかにすることで定量的化学物質発がん性予測への適用性を検証するとともに、OECD テストガイドライン等へ適用させることを目指す。

特に、実際の人健康に関する有害性評価での定量的発がん性評価の現状と課題を踏まえた適切な活用場面・方法に焦点を絞りつつ（井上）、クロマチン免疫沈降法（ChIP 法）やクロマチン定量プロテオミクス法など最新の技術等を活用し、さらには生体内代謝も勘案した上でゲノム毒性発現初期反応である DNA 損傷応答や関連する分子反応等を定量定性的に捉える新手法（DDR 法）を開発し（堀端、安井、石井、松田）、また、エラー修正型次世代シーケンス手法（ecNGS 法）について、データ拡充のためホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織標本等への適用性等を検証する（杉山、鈴木、諸角）。加えて、遺伝毒性の無作用量がみられる低用量下における *in vivo* 変異原性と発がん性の用量相関関係に DNA 損傷応答等が重要な影響を与えていることから、発がん性試験と DNA 損傷応答反応等との相互相関性を明らかにするとともに、DDR 法を適用して相互の定量定性的な相関を明らかにする（魏）。研究班全体として新手法の適用性検証を踏まえ、既存の発がん性

試験等の入手可能な検体等への幅広い適用検証を試み、既存の方法と新手法との定量定性的な相関関係を明らかにするとともに、国際ガイドライン等への適用を進める（全員）。特にDDR法では曝露からゲノム毒性発現に至る経時的な解析が可能であることから、時間的検証および試験期間の短縮化も検討する（堀端、松田）。

B. 研究方法

「化学物質の人健康に関する有害性評価における定量的発がん性評価の現状・課題の整理と各種新規解析手法の活用場面の検討」（担当：井上）

有害性評価が技術ガイダンスなど明文化された文書に基づき行われている化審法の優先評価化学物質に関する発がん性の定量的評価の現状を調査し、具体的な評価事例に基づき課題を整理した。また、最近、初期リスク評価のスキーム及び詳細リスク評価の考え方が整備された室内空気濃度指針の設定のための有害性評価と、家庭用品のための有害性評価における発がん性の定量的評価の現状についても調査した。

「DNA 損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法（DDR 法）の開発」（担当：堀端・松田）

堀端担当部分では、クロマチン免疫沈降法（ChIP）とクロマチン分画ウエスタンブロット法（ChWB）を適用して DNA 損傷応答反応解析を実施した。ChIP 法では、先行研究により明らかにした「拡大希釈および終夜脱架橋」により動物組織標本を可溶化し、抗 APE1 抗体を用いる

ChIP 法に適用した。動物組織標本は従来の *in vivo* 遺伝毒性評価で実施されている *in vivo* 末梢血小核試験の投与プロトコルを参照して先行研究で作成した以下のものを使用した。C57BL/6NCrSlc マウス（8 週齢、雄、各群 3 匹）に、PBS、*N*-ethyl *N*-nitrosourea（ENU）（100、50 または 25 mg/kg 体重/回）、Ethylmethanesulfonate（EMS）（200、100 または 50 mg/kg 体重/回）または 2-Acetylaminofluorene（2-AAF）（200、100 または 50 mg/kg 体重/回）を 24 時間ごとに 2 回腹腔内投与し、最終投与後 24 時間後に肝臓および血液を採取し、肝臓は 10%中性緩衝ホルマリン液で終夜固定を行い、PBS で洗浄後に凍結保存した。血液については *in vivo* 小核試験に適用した。

ChWB 法では、パイロットスタディとして、培養細胞に紫外線照射または ENU を処理し、塩濃度の異なる可溶化バッファで細胞を可溶化し、残る不溶性画分を SDS sample buffer で可溶化したものをクロマチン画分とした。得られたそれぞれの画分において、 γ H2AX、モノユビキチン化 PCNA、APE1 または POLB を認識する抗体を使用した ChWB によりそれぞれのタンパク質の分画を解析した。

松田担当部分では、クロマチン定量プロテオミクス法を実施した。ヒトリンパ芽球由来 TK6(IVGT)細胞を所定濃度および時間のエトポシド（ETP）に曝露した後、液体窒素による凍結融解で細胞の膜を破壊した。細胞ペレットを等張液で洗浄し、遊離（クロマチンに結合していない）タンパク質を抽出除去した。ペレットを高張液で洗浄することで、クロマチンに弱く結合するタンパク質を抽出した（画分

①)。残ったペレットに2 M NaClを添加して超音波破碎処理でクロマチンを破壊後、遠心分離で上清を回収した（画分②）。各画分のタンパク質をトリクロロ酢酸沈殿法で回収した。タンパク質をデオキシコール酸ナトリウム（SDC）を含む緩衝液で再溶解し、内部標準として測定対象のペプチドに対応する安定同位体を添加した。これをジチオスレイトール及びヨードアセトアミドで還元アルキル化し、トリプシン消化を行った。固相抽出で消化物（ペプチド）を脱塩精製して5%アセトニトリルに再溶解し、高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析装置（LC-MS/MS）で、測定対象タンパク質に特異的なペプチドを定量した。LC-MS/MSには Waters 社 Xevo TQ-S を使用し、Multiple reaction monitoring モードで測定した。

「第Ⅱ相薬物代謝も勘案した *in vitro* 小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究」（担当：安井）

薬物代謝の第Ⅰ相、および第Ⅱ相代謝酵素は、遺伝毒性物質の活性化や解毒に重要な役割を担う。しかし、*in vitro* 遺伝毒性試験では第Ⅱ相代謝酵素の機能がほとんど勘案されておらず、*in vitro* と *in vivo* 試験結果のギャップを生じさせる要因の一つと考えられる。本研究では、ラット肝 S9 の第Ⅰ相および第Ⅱ相代謝酵素を機能させるため、それらの補因子を補充した *in vitro* 小核試験系を構築し、代謝酵素機能の有無で変化する DNA 損傷応答（*in vitro* 小核試験）を同定・定量し、先のギャップの原因を明らかにすることで発がん性

定量評価の予測向上に寄与する。

令和7年度は、第Ⅱ相薬物代謝酵素の硫酸転移酵素（SULT）を機能させる補因子 PAPS を補充した *in vitro* 小核試験系を構築するために、PAPS 補充、あるいは PAPS 合成系（PAPS-Generating System; PGS）を用いて小核細胞の誘発が2倍程度に増加する陽性対照物質を探索した。その候補物質として、アリストロキア酸Ⅰ（AA-I）を用いた。AA-I の発がん性は、少なくとも SULT 酵素が関与していると考えられ、AA-I の DNA 付加体を増加させることがよく知られている。実験プロトコールは OECD テストガイドライン TG-487 に従った。統計解析は、2～3回の小核試験（計3000～6000細胞当たりの小核保有細胞を計測）を実施し、t検定（有意水準5%）を行った。

「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」（担当：石井）

病理標本を用いた小核検出法の有用性を検討した。本年度は、小核で発現が報告されているタンパクを指標とした免疫組織化学染色法（IHC）による小核検出を検討した。また、これまでに構築してきた抗 γ H2AX 抗体を用いた IHC による病理組織学的肝臓小核試験（HMN assay）の有用性を確認するため、遺伝毒性肝発がん物質である 2,4-dinitrotoluene（2,4-DNT）と p-dimethylaminoazobenzene（DAB）をそれぞれ100 mg/kg体重/日、非遺伝毒性肝発がん物質である clofibrate（CFB）を400 mg/kg体重/日の用量で、F344ラットに28日間強制経口投与し、肝臓の病理組織学的検索、HMN assay および肝臓小核試験を実施した。

「ecNGS 法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」（担当：杉山、鈴木、諸角）

R7 年度は、まず *in vivo* における用量反応性評価への ecNGS 法（ECS 解析）の適用可能性を検証するため、既存研究において用量反応性が示されているエレミンを対象とした解析を実施した。エレミン投与ラット試料を用い、変異頻度および変異スペクトルの用量依存性を評価することで、ラット試料における ECS 解析の有効性を確認する設計とした。

加えて保存組織への応用を見据え、ecNGS 法をホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルへ展開するための基盤整備を進めた。具体的には、固定条件や処理履歴が明確で既存の遺伝毒性データ（*gpt* アッセイ等）と比較可能なサンプル、あるいは作成条件が規定された試験用サンプルを候補とし、解析目的に最も適したサンプル条件を評価した。併せて、PacBio 社 Revio による HIFI リードを用いた ECS 法応用可能性をデモデータで評価したほか、Illumina 社以外の 3 種のショートリードシーケンサー（Onso、DNBSEQ、AVITI）について原理およびデータ特性を検討し、PECC-seq 性能向上への有効性を検証した。

「発がん性試験と遺伝毒性試験や DNA 損傷応答反応等との相互相関性解析と DDR 法等の適用検証」（担当：魏）

これまでに実施した遺伝毒性肝発がん物質であるヘテロサイクリックアミン MeIQx（0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100

ppm）、IQ（0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ppm）およびニトロソ化合物 DEN（0, 0.0001, 0.001, 0.1, 1, 10 ppm）を 16 週間投与した試験により得られたラット肝組織を用い、7 種類の DNA 損傷応答（DDR）関連タンパク質〔 γ -H2AX、p21^{Waf1/Cip1}、MOK（MOK protein kinase）、APE1（Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1）、HP1 α （Heterochromatin Protein 1 alpha）、PHLDA3（Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 3）、MYBL1（MYB proto-oncogene like 1）〕の発現を免疫組織化学的に解析した。

さらに、新たに DEN を 0（対照群）、1、10 および 50 ppm で飲水投与するラット肝発がん実験を実施した。本試験では、発がん早期である 12 週（前がん病変形成期）および腫瘍形成期である 20 週に肝組織および肝腫瘍を採取し、snRNA-seq 解析を実施することで、DEN 投与に伴い変動する細胞集団、DDR 関連分子の発現変動を示す細胞集団、ならびに新規 DDR 関連分子候補の同定を行った。

（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

「化学物質の人健康に関する有害性評価における定量的発がん性評価の現状・課題の整理と各種新規解析手法の活用場面の検討」(担当：井上)

化審法における優先評価化学物質の有害性評価では、詳細評価の優先順位付けの段階である評価Ⅰから、発がん性の定量的評価（有害性評価値の導出）を行っている。発がん性の定量的評価を行う際は、遺伝毒性（変異原性）に関する試験結果に基づき、発がん性の閾値の有無を判断することになる。そのため、一般化学物質（優先指定されていない既存化学物質）及び優先評価化学物質のための遺伝毒性評価の現状についても示し、発がん性の定量的評価に関する課題を整理した。

一般化学物質を対象とするスクリーニング評価の段階では、突然変異誘発性だけでなく、染色体異常試験や小核試験など染色体異常をエンドポイントとした試験法についても評価することとなっている。また、スクリーニング評価における発がん性評価は定性的であり、国内外の機関が公表している発がん性に係る分類結果に基づき有害性クラスを判定するに留まっている。つまり、スクリーニング評価の段階では、遺伝毒性（変異原性）の評価結果が発がん性評価に反映されることはなく、評価対象物質の遺伝毒性（突然変異誘発性及び染色体異常）の有無を判断している。

一方、スクリーニング評価の結果、優先評価化学物質に指定された物質群は、詳細評価（評価Ⅱ）の優先度判定を行う

評価Ⅰ段階に進むが、評価Ⅰにおける発がん性については、可能であれば新たに収集した既存の定量情報に基づく有害性評価値の導出を行うこととなっているため、発がん性の定量的評価にあたっては、遺伝毒性（変異原性）の評価結果に基づき発がん性の閾値の有無を判断しなければならない。この発がん性の閾値の有無の判断は、評価対象物質が直接 DNA に作用し突然変異を誘発するか（真の意味での変異原性を有するか）否かで決定されるため、基本的には「突然変異誘発性をエンドポイントとする試験結果」に基づき行われており、この判断を下す過程において、染色体異常をエンドポイントとする試験結果は、*in vivo* の試験結果であっても、その意義は低い。評価Ⅰの結果、詳細評価が必要と判断された優先評価化学物質は、評価Ⅱに進むが、この段階での遺伝毒性の評価は、評価対象物質が発がん性を有する場合、その閾値の有無を判断するため「突然変異誘発性があるか否か」を判断する目的で行われる。つまり、現行の有害性評価において、発がん性の定量的評価を行うにあたっては、「突然変異誘発性の有無」を判断できればよい状況となっている。また、評価Ⅰ及び評価Ⅱにおける発がん性の定量的評価では、閾値の有無に応じて有害性評価値の導出方法が異なるため、「突然変異誘発性の有無」を明確に判断できることが、非常に重要になる

評価Ⅰ及び評価Ⅱにおける実際の評価結果を調査し、突然変異誘発性及び発がん性の閾値の有無の判断における課題を抽出することを試みた結果、2つの課題を抽出した。

①変異原性を有することが確認された

ものの、発がん性の定量的評価に資する有害性情報がないために、発がん性の定量的評価ができないこと。

②変異原性の有無を明確に判断できる遺伝毒性試験結果がない場合、発がん性の閾値の有無（発がん性の有害性評価値導出方法）の決定が困難であること。

その他、室内空気濃度指針設定や家庭用品のための有害性評価においても、上記①及び②の課題に直面する可能性があり、状況としては化審法と同様であると考えた。

「DNA 損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法（DDR 法）の開発」（担当：堀端・松田）

堀端担当部分の ChIP 法では、2-AAF 以外の投与群の解析が終了した。*in vivo* 小核試験では陽性であったが、ChIP 法では先行研究で実施した培養細胞を用いる ChIP 法と比較し、%Input 値自体が著しく低く、また、各群の%Input 値に統計学的有意差が見られなかった。

ChWB 法では、紫外線照射後のクロマチン画分において、照射後の培養時間依存的な γ H2AX の増加が検出された。モノユビキチン化 PCNA も同様に、照射後の培養時間依存的な増加が検出された。モノユビキチン化 PCNA は、可溶化画分、特に生理的塩濃度での可溶化画分（150 mM NaCl の可溶化画分）においてもクロマチン画分と同様の結果であった。150 mM NaCl の可溶化画分中、APE1 と POLB はともに ENU 処理の有無に関わらず、検出量に変化は見られなかった。生理的塩濃度での不溶化画分に高塩濃度バッファーを処理して得られる可溶化画分では、APE1 と

POLB はともに ENU 処理後 4 時間で検出量の増大が見られ、24 時間経過後も残存した。クロマチン画分においても同様の結果が得られた。

松田担当部分であるクロマチン定量プロテオミクス法では、使用する培養細胞として TK6(IVGT)細胞を、遺伝毒性発がん物質としてトポイソメラーゼ II 阻害剤 ETP を選択した。まず用量設定のために細胞毒性試験を行い、24 h 曝露で生細胞密度が陰性対照の半分となる濃度 (IC_{50} : 0.115 μ M) を求めた。次に、TK6(IVGT)細胞を IC_{50} の ETP に曝露した後、5 種類の DNA 損傷応答及び修復タンパク質のクロマチン画分中存在量の経時変化を最長 24 h まで測定した。DNA 損傷のバイオマーカーとして知られる γ H2AX (H2AX の S139 リン酸化体) は、曝露 3 h 以降から検出され、24 h まで経時的に増加した。DNA 損傷応答タンパク質について、MDC1 のクロマチン結合量は曝露 1 h から増加してほぼプラトーに達し (0 h 比で最大 4.6 倍)、53BP1 は曝露 1 h から増加し、曝露 24 h で最大 (同 54.9 倍) となった。DNA 二本鎖切断修復を担う RAD50 及び XRCC6 のクロマチン結合量は曝露 1 h から増加し、RAD50 は曝露 6 h で最大 (同 3.9 倍) となり、XRCC6 は曝露 24 h まで経時的に増加した (同 157.1 倍)。一方、H2AX (未リン酸化体) のクロマチン中存在量に 2 倍以上の変動は見られなかった。

「第II相薬物代謝も勘案した *in vitro* 小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究」（担当：安井）

In vitro 小核試験の用量設定試験は、AA-

I を DMSO に溶解させ、2 mg/mL を最高用量として公比 3 で実験を行った。最終濃度 222 µg/mL 以上で析出が観察された。OECD テストガイドラインに推奨されている細胞毒性指標として RPD を用いた。RPD 値が 45±5% となる最適用量が 222 µg/mL であることが分かった。しかし、300 µM PAPS を補充する予備実験において、非補充群よりも補充群の細胞毒性が増強されることが判明したため、PRD 値が 50 ±5% 程度を最適用量として用量設定試験を行った。その結果、AA-I の最適用量は 64.1~94.1 µg/mL の範囲が良好であることが分かった。

PAPS 補充、あるいは PGS 補充した *in vitro* 小核試験の本試験を実施した結果、PAPS 補充実験では、あまり有意な差が観察できなかったが、PGS 補充実験では非補充群より補充群のほうが、74.1 µg/mL 以上の複数の用量群で統計的有意差が得られた（約 45.2% の増加）。

「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」（担当：石井）

invitrogen 社製抗 cGAS 抗体（PA5-141097 及び PA5-121188）及び抗 POLQ 抗体（PA5-115130）を用いて、IHC による小核の検出を検討した。その結果、抗 cGAS 抗体では良好な染色像は得られず、抗 POLQ 抗体では一部の小核が陽性を呈したものの、陰性の小核も認められた。抗 γH2AX 抗体を用いた HMN assay の有用性評価では、2,4-DNT、DAB 及び CFB を、100、100 及び 400 mg/kg 体重/日の用量で F344 ラットに 28 日間強制経口投与した。その結果、全ての投与群において、投与一週目から体重増加抑制が見られ、最

終体重は全ての投与群で対照群に比して有意な低値を示した。剖検の結果、肝実重量は CFB 群において、肝比重量は全て投与群で有意に上昇した。肝臓の病理組織学的検索では、2,4-DNT 群において、卵円形細胞の過形成、空胞変性及び単細胞壊死の増加が、CFB 群において肝細胞肥大及び顆粒状変性が見られた。HMN assay では、2,4-DNT 及び DAB 群において肝臓の小核含有細胞（MNHEP）の有意な上昇が認められたのに対して、肝臓小核試験では、全ての投与群において MNHEPs の頻度が上昇した。

「ecNGS法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」（担当：杉山、鈴木、諸角）

R7 年度は、まず *in vivo* における用量反応性評価への ECS 解析の有用性を検証した。過去の研究において用量反応性が示されているエレミシン投与ラット試料を用いて ECS 解析を行った結果、エレミシン投与群において変異頻度は用量依存的に増加することが確認された。また、エレミシンに特徴的とされる T>A および T>C の変異スペクトルについても、用量反応性が認められた。これらの結果から、ECS 解析がラット試料における *in vivo* 変異原性評価に有用である可能性が示唆された。

さらに次年度に ecNGS 法を FFPE サンプルへ適用するための実験体制を整備した。キノリン曝露 *gpt delta* ラット肝臓 FFPE（3 用量＋対照）が提供され、用量反応評価および *gpt* アッセイとの比較を可能とする基盤が確立した。また、抽出条件比較に用いる別ロット FFPE も確保した。さら採

用する ecNGS 手法として長鎖リード技術では、PacBio 社 Revio の HIFI リードが ECS 法に有用である可能性を検討し、初期設定変更により相補鎖ごとのコンセンサス配列等が取得可能であることをデモデータで確認した。ショートリードでは、PECC-seq 性能向上を目的に複数機種を評価し、AVITI について適応可能性を検討中である。

「発がん性試験と遺伝毒性試験や DNA 損傷応答反応等との相互相関性解析と DDR 法等の適用検証」(担当：魏)

MeIQx、IQ および DEN を 16 週間投与したラット肝組織において、7 種類の DDR 関連タンパク質の発現を免疫組織化学的に解析した結果、 γ -H2AX などの陽性細胞は、MeIQx (100 ppm)、IQ (100 ppm) および DEN (10 ppm) の高用量群において認められた。しかしながら、いずれの物質においても陽性率が低く、DNA 損傷応答反応を定量的評価指標として適用するには限界があることが示唆された。なお、他の DDR 関連タンパク質については本研究の検討条件下で明確な陽性像は認められなかった。

DEN 誘発ラット肝発がん試験については、12 週投与実験を終了し、DEN 用量依存的な GST-P 陽性細胞巢形成を確認した。10 ppm 群では 10 細胞以上からなる GST-P 陽性細胞巢が認められ、50 ppm 群では肝実質の大部分が GST-P 陽性を示した。さらに、対照群および 50 ppm DEN 投与群の 12 週時点肝組織を用いた snRNA-seq 解析により、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、DEN 投与に伴い変動する複数の細胞集団が抽出された。DEN 投与群では、Gstp1 陽性前がん病変関連細胞集団および DDR 活性の上昇傾向を示す DEN 応答性細胞集団が同定された。20 週投与試験も終了しており、現在、肝腫瘍サンプルを対象とした snRNA-seq 解析に向けて準備を進めている。

D. 考察

「化学物質の人健康に関する有害性評価における定量的発がん性評価の現状・課題の整理と各種新規解析手法の活用場面の検討」(担当：井上)

化審法、室内空気濃度指針、家庭用品のためのリスク評価における発がん性の定量的評価の現状と課題を整理した結果、前項に示した通り、2 つの課題があることを確認することができた。

①及び②の課題を解決するには、理想的には OECD テストガイドラインに準拠したトランスジェニックげっ歯類の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験、または発がん性試験を追加で実施することが望ましい。しかしながら、既存物質を対象とした評価の場合、動物実験の追加実施（特に発がん性試験）は動物愛護やコストの面で現実的ではない。したがって、本研究事業により、遺伝毒性（変異原性）に関する新たな解析方法を確立し、遺伝毒性（変異原性）の観点から、発がん性試験データがなくても半定量的（強/中/弱）あるいは定量的（有害性評価値）に「発がん性の強さ」を見積もることを可能にする手法を確立することの重要性が高いと考える。

本検討では、発がん性の定量的評価の現状を踏まえ、変異原性に着目した。しかしながら、発がん性機序の中には、突然変異誘発性以外の各種遺伝毒性関連イベントが関与することが知られる。また、発がん性を有することが明らかな化学物質に定量的評価に資する発がん試験データがなければ有害性評価値を導出することができないことは、変異原性の有無に関係なく共通の課題となる。本研究事業は、発がん性に関与する可能性がある各種遺伝毒性関連イベント（DNA 損傷応答、染色体不安定性、代謝活性化依存的な遺伝毒性、次世代シーケンスにより検出される変異頻度・変異スペクトル等）に着目して取り組んでいるが、これらのイベントと発がん性の定量性との相関性を明らかにし、新たな評価手法を確立することは、「発がん性の定量的評価に資するデータ取得」が可能な環境の基盤整備につながると考えた。

「DNA 損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法（DDR 法）の開発」（担当：堀端・松田）

堀端担当部分の ChIP 法では、培養細胞を用いた先行研究で得られる %Input 値と比較し、動物標本を用いた ChIP 法での %Input 値は著しく低いため、可溶化の際の終夜脱架橋により DNA 損傷応答解析の標的である DNA 損傷応答タンパク質がクロマチン画分から遊離している可能性が考えられた。組織標本のように長時間強くホルマリン架橋されたサンプルを ChIP 法に適用できる組織標本可溶化条件を見出すのは非常に困難である。

ChWB 法では、 γ H2AX、モノユビキチ

ン化 PCNA、APE1 および POLB において、DNA 損傷依存的な DNA 損傷応答が観察された。これらの結果は紫外線照射およびアルキル化剤によって誘発されるクロマチン画分上の DNA 損傷応答反応をこの方法で検出できることを示している。特に、突然変異を誘発する主要因であると考えられている DNA 損傷応答反応の一つとして知られる損傷乗り越え DNA 合成には PCNA のモノユビキチン化反応が非常に重要であることが知られていることから、今回得られた結果は非常に有望であると考えられる。

松田担当部分であるクロマチン定量プロテオミクス法では、既報（松田ら, *Genes Environ.* 45:37 2023）の前処理法を改変した。具体的にはトリプシン消化に用いるタンパク質変性剤を尿素から SDC に変更し、尿素に起因する副反応（タンパク質の N 末端や側鎖のアミノ基のカルバミル化）を抑制した。さらに、ゲノム DNA 断片化を DNase I 添加による消化から超音波破碎に変更し、夾雑成分を低減した。本研究では ETP 曝露により、TK6(IVGT)細胞中の γ H2AX 含め各種 DNA 損傷応答・修復タンパク質のクロマチン結合量が増加した一方、これらの変動はタンパク質によって異なることを明らかにした。ETP の血漿タンパク質結合率（94%）に基づけば、標準用量（100 mg/m²）の投与患者の遊離体血中最大濃度は約 1 - 2 μ M であり、血中終末半減期 6 - 18 h を考慮する（IARC Monographs Vol.76）と、本研究で採用した濃度（0.115 μ M）はヒトで実際に到達しうる条件であると考えられる。現在さらなる低用量域におけ

る、ETP とクロマチン画分中各種 DNA 損傷応答及び修復タンパク質の用量応答を測定中である。さらに他の DNA 損傷応答・修復タンパク質や、細胞周期制御やヒストン修飾など、測定対象の拡大も進めており、これにより多様なメカニズムを有する遺伝毒性発がん物質の発がん性評価に貢献できる可能性がある。

「第II相薬物代謝も勘案した *in vitro* 小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究」(担当：安井)

PAPS試薬では不十分だが、PGS系を用いることにより、ラットS9中に含まれるSULTの機能を十分に利用した*in vitro*小核試験を実施できることが分かった。*In vitro*試験の最大のメリットは、早く安価に化学的な作用機序を明確化できることである。本研究においては、*in vitro*でPAPS合成を行えるPGS補充による小核試験において、もし、PGS補充で陽性、PGS非補充で陰性となった場合、PGSの有無だけで陽性陰性に違いが示されるため、その被験物質は、SULTのPAPS抱合化によって、遺伝毒性が活性化（陽性）したことを証明できる。単に*in vitro*試験で陽性になっただけでなく、代謝酵素機能の有無で変化するDNA損傷応答の原因が明らかになることで発がん性の定量性の予測向上、およびその作用機序も理解することができる。

AA-Iの発がんには、少なくともSULTの関与が明らかとされている (Sidorenko et al. *Carcinogenesis*.35, 1814-22 (2014) ; Hashimoto et al. *Carcinogenesis* 37, 647-55 (2016); Arlt et al. *Arch Toxicol*. 91, 1957-75 (2017))。今回、PGS 補充した *in vitro* 小核

試験でも遺伝毒性が活性化されたことが確認でき、既報と一致したため、現段階において、本実験系は有用であると考えられた。

「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」(担当：石井)

抗 cGAS 抗体及び抗 POLQ 抗体による小核の検出を検討したが、いずれも良好な染色性は見られず、従来の抗 γ H2AX 抗体を用いた IHC が小核の検出に有効であることが確認された。遺伝毒性及び非遺伝毒性肝発がん物質を用いた HMN assay の有用性評価では、2,4-DNT 及び DAB 投与群において両試験で小核含有肝細胞頻度の有意な増加が認められ、CFB 投与群で変化がみられなかったことから、本法は遺伝毒性肝発がん物質の検出が可能であるのに対し、一部の非遺伝毒性肝発がん物質は検出できない可能性が示唆された。また、CFB 投与群では肝臓小核試験の結果と相違が見られたが、肝臓小核試験では細胞増殖細胞の増加が認められなかったことから、前処理過程における細胞破壊とそれに伴うアーティファクトが生じていることが示唆された。それ故、本試験の結果については再現性の確認が必要と考えられた。

「ecNGS 法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」(担当：杉山、鈴木、諸角)

R7年度は主として ecNGS 法の *in vivo* 用量反応性評価に対する有効性検証と、FFPE サンプルへの展開に向けた基盤整備を行った。エレミシン投与ラット試料に

において、変異頻度および特異的な変異スペクトル (T>A、T>C) が用量依存的に増加したことは、ECS 解析が生体内における変異原性を定量的に捉え得ることを示す重要な知見である。特に、既存の遺伝毒性知見と整合する結果が得られたことから、本手法が発がん性評価に資する指標として機能する可能性が示唆された。

一方、FFPE サンプルでは、ホルマリン固定に伴う架橋構造や人工的塩基修飾に起因するシークエンスエラーが大きな課題となる。本年度は、こうした制約を踏まえた技術的整理を行い、比較可能な FFPE サンプル確保および解析条件検討の方向性を明確化した。今後、抽出法や前処理条件の最適化を通じてアーティファクトを低減できれば、保存試料を活用した遺伝毒性評価の適用範囲が大きく拡張されると期待される。また、PacBio HiFi リードの活用により、従来法では困難であった解析への展開も視野に入る。

「発がん性試験と遺伝毒性試験や DNA 損傷応答反応等との相互相関性解析と DDR 法等の適用検証」(担当：魏)

本研究で免疫組織化学的に検討した DDR 関連タンパク質の多くは、これまでの mRNA 発現解析により同定された分子であり、mRNA マーカーとしては十分な感度を有する一方で、免疫組織化学的手法による可視化タンパク質マーカーとしては、十分な感度が得られないことが示唆された。また、本研究における γ -H2AX の免疫組織化学的解析の結果から、発がん初期における DNA 損傷応答は、肝臓内の特定の少数細胞集団に限局して生じている可能性が示

唆され、細胞集団レベルで DDR 応答を解析する必要性が考えられた。そこで、DEN 誘発ラット肝発がんモデルを用いて snRNA-seq 解析を実施した。

そこで、DEN 誘発ラット肝発がんモデルを用いて snRNA-seq 解析を実施したところ、12 週時点の肝組織において、DEN 投与に伴い変動する細胞集団が抽出され、さらに Gstp1 陽性前がん病変関連細胞集団および DDR 活性の上昇傾向を示す DEN 応答性細胞集団が同定された。これらの結果から、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、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。20 週投与試験も終了しており、今後、肝腫瘍を対象とした解析を進め、12 週の前がん病変形成期サンプルとの統合解析により、発がん進展過程で維持または増強される DDR 関連細胞集団および新規 DDR マーカー候補の検証を行う予定である。

E. 結論

「化学物質の人健康に関する有害性評価における定量的発がん性評価の現状・課題の整理と各種新規解析手法の活用場面の検討」(担当：井上)

本検討では、化審法、室内空気濃度指針、家庭用品のためのリスク評価における発がん性の定量的評価の現状と課題を整理した。その結果、変異原性の有無を明確に判断できる遺伝毒性情報が不足する場合には発がん性の閾値の有無の決定が困難であること、また、変異原性が確認されても発がん性の定量的評価に資する有害性情報が不足する場合には定量的

評価ができないことが明らかとなった。これらの課題に対応するためには、変異原性のみならず、DNA 損傷応答、染色体不安定性、代謝活性化依存的な遺伝毒性、次世代シーケンスにより検出される変異頻度・変異スペクトル等の各種遺伝毒性関連イベントに着目し、それらと発がん性の定量性との相関性を明らかにすることが重要である。本研究事業でこれらの評価手法を確立することにより、発がん性試験データが不足する化学物質についても、発がん性の強さを半定量的又は定量的に見積もるための基盤整備につながると考えられた。

「DNA 損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法（DDR 法）の開発」（担当：堀端・松田）

堀端担当部分の ChIP 法では、組織標本可溶化の際の終夜脱架橋により DNA 損傷応答解析の標的である DNA 損傷応答タンパク質がクロマチン画分から遊離している可能性が考えられた。組織標本のように長時間強くホルマリン架橋されたサンプルを ChIP 法に適用できる組織標本可溶化条件を見出すのは非常に困難である。

ChWB 法では、DNA 損傷依存的な DNA 損傷応答、特にモノユビキチン化 PCNA のクロマチン画分への分画が観察された。これらの結果は紫外線照射およびアルキル化剤によって誘発されるクロマチン画分上の DNA 損傷応答反応をこの方法で検出できることを示している。DNA 損傷応答は *in vivo* および *in vitro* は遺伝毒性につながる重要な指標であるため、これらの DNA 損傷応答検出システムは *in vivo* と *in vitro* の両方の遺伝毒性評価に適用できる

可能性がある。

松田担当部分であるクロマチン定量プロテオミクス法では、前処理法を改良し、処理中の副反応（タンパク質の N 末端や側鎖のアミノ基のカルバミル化）の抑制、試料に添加する夾雑物の低減を行った。確立した手法の概念実証のために、TK6(IVGT)細胞と遺伝毒性発がん物質 ETP を用いた曝露実験を実施した。ETP 曝露によりクロマチン画分中の DNA 損傷応答・修復タンパク質 (γ H2AX、MDC1、53BP1、RAD50、XRCC6) が増加したことを確認し、これらタンパク質のクロマチン結合量の増加が発がん性評価の指標となり得ることを示した。IARC 資料に基づく ETP の臨床用量における遊離体の血漿中最大濃度 ($1-2 \mu\text{M}$) 及び血中終末半減期 ($6-18 \text{ h}$) を考慮すると、本研究で採用した曝露濃度 ($0.115 \mu\text{M}$) は、臨床用量で実際に到達し得る ETP 濃度域に相当し、この実際的な濃度条件下で生じるクロマチン結合タンパク質の変動を捉えた点において、生物学的に妥当な発がん関連応答の評価系であることを示している。

「第II相薬物代謝も勘案した *in vitro* 小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究」（担当：安井）

ラット肝 S9 存在下の条件で、SULT の補因子 PAPS を合成する系を *in vitro* 小核試験に補完することによって、PGS 補充型の *in vitro* 小核試験系をほぼ構築できたと考えられた。一方、そのための陽性対照物質が必要であるが、非補充群に対して、補充群が約 2 倍程度の小核細胞数を誘発させられる陽性対照物質を見つけることが

できていない。より多くの小核細胞数を誘発させる強い遺伝毒性化学物質を引き続き探索したいと考えている。

「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」（担当：石井）

免疫組織化学染色に病理切片における小核の検出には、抗 γ H2AX抗体が有効であることを明らかにした。また、HMN assayは2,4-DNT及びDABのような遺伝毒性肝発がん物質を検出可能であり、肝発がん性評価法として有用であることが示された。一方、CFBでは明らかな変化は認められず、一部の非遺伝毒性肝発がん物質は検出できない可能性が示唆された。今後さらなる検討を行い、本法の適用範囲と限界を明らかにする必要があると考えられた。

「ecNGS法を用いた発がん性予測手法の開発に資する遺伝毒性評価法の開発」（担当：杉山、鈴木、諸角）

R7年度において、まず *in vivo* 用量反応性評価に対する ECS 解析の有効性を検証し、加えて FFPE サンプルへの展開に向けた研究基盤を整備した。過去の研究において用量反応性が示されているエレミン投与ラット試料に対する ECS 解析により、変異頻度および特異的な変異スペクトルが用量依存的に変化することが確認され、本手法がラット試料における変異原性を定量的に評価し得る可能性が示された。

これらの知見を踏まえ、保存試料を対象とした応用展開として、キノリン曝露 *gpt delta* ラット肝臓 FFPE サンプルおよび検討用 FFPE 試料を確保し、次年度に予定

する DNA 抽出条件の比較試験やライブラリ調製条件最適化に向けた体制を構築した。以上より、本年度は、ecNGS 法を用いた *in vivo* 遺伝毒性評価の有効性を示すとともに、FFPE サンプルでの本格的解析に向けた基盤整備を完了した。今後は、R8年度における FFPE 由来 DNA 特性の定量評価および解析条件の最適化を経て、R9年度の ecNGS 法による FFPE 解析と発がん性予測手法としての妥当性検証へと展開する計画である。

「発がん性試験と遺伝毒性試験や DNA 損傷応答反応等との相互相関性解析と DDR 法等の適用検証」（担当：魏）

ヘテロサイクリックアミンおよびニトロソ化合物の16週間投与試験で得られたラット肝組織を用い、既知の7種類のDDR関連タンパク質発現を免疫組織化学的に解析した結果、発がん初期におけるDNA損傷応答を定量的に評価するには、感度面で一定の課題があることが示唆された。一方、DEN誘発ラット肝発がんモデルを用いたsnRNA-seqによる細胞集団別解析により、発がん初期のDDR応答細胞集団の同定が可能であり、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。

本研究班では、発がん性の定量的評価に資する情報が不足している化学物質を対象に、既存の変異原性試験（Ames 試験等）を前提としつつ、それらを補完する

新規ゲノム安全性評価指標の探索および検証を目的として、複数の分担研究を実施した。各分担研究は、DNA 損傷応答、染色体不安定性、変異原性の用量反応解析、代謝を考慮した遺伝毒性評価など、発がん過程の異なる段階や側面を捉えるものであり、相互に補完的な関係にある。

本年度の検討を通じて、単一の指標のみで発がん性を定量的に評価することには限界がある一方で、複数のゲノム安全性指標について、それぞれの有用性、適用範囲および限界を整理することで、行政評価における活用可能性を段階的に検討できることが示された。本研究の最終的な到達点としては、これらの知見を統合し、行政評価においてどのような場面で、どのように活用可能であることを示す評価の考え方および科学的知見として体系的に取りまとめることを想定している。

一方で、新規試験法や評価手法をガイドラインとして位置づけるためには、再現性や妥当性に関する十分なデータの蓄積に加え、国内外の専門家間での合意形成が不可欠であり、通常は複数年にわたる検討と国際的な議論を要する。そのため、本研究期間内にガイドライン策定そのものを完了することを目的とするのではなく、将来的な試験法や評価手法の検討・高度化、あるいはガイドライン検討に資する科学的根拠および技術的整理を提示することを重要な成果として位置づけている。

今後は、各分担研究により得られた成果を基に、既存の発がん性試験結果や遺伝毒性試験結果との関係性を整理し、行政評価における位置づけや活用可能性を

より明確化することで、発がん性評価の高度化に資する基盤的知見の集積を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Morozumi R, Shimizu N, Amimoto T, Yamamoto J, Tsuda M. A chemical labeling method for selective conjugation to DNA 3'-phosphoglycolate termini. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2026. doi:10.1080/15257770.2026.2645371.
2. Inoue K, Hirabayashi Y, Azuma A. Detailed hazard assessment of ethylbenzene to establish an indoor air quality guideline in Japan. *Environ. Health. Prev. Med*. 2025. 30: 34.
3. Matsumoto M, Natsume M, Iso T, Umamo T, Murata Y, Masumura K, Horibata K, Sugiyama KI. Increased mutagenicity in the liver of MutaMouse females following oral treatment with commercial-grade toluene diisocyanate. *Genes Environ*. 2025;47:12.
4. Hotani T, Goto M, Otsuki Y, Matsuda S, Wada N, Shinohara M, Matsuda T, Yokoi M, Sugawara K, Ohsaki Y, Sakai W. Dynamics of Fanconi anemia protein D2 in association with nuclear lipid droplet formation. *J Cell Sci*. 138(21):jcs264430, 2025
5. Mitsumoto T., Ishii Y, Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Toyoda T., Ogawa

- K. Evaluation of 2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramide by a comprehensive toxicity study using gpt delta rats. *Toxicol. Appl. Pharm.* 507, 117686 (2026)
6. Takimoto N., Ishii Y., Mitsumoto T., Takasu S., Namiki M., Toyoda T., Shibutani M., Ogawa K. Involvement of nuclear atrophy of binucleated hepatocytes in the large micronucleus formation induced by rat hepatocarcinogen acetamide. *Toxicol. Appl. Pharm.* 496, 117243 (2025).
7. Application of error-corrected sequencing technologies for in vivo regulatory mutagenicity assessment. Yauk CL, Lynch AM, Dobrovolsky VN, Schuler M, Smith-Roe SL, Fitzgerald D, Higgins J, Honarvar N, Le Curieux F, Matsumura S, Minocherhomji S, Recio L, Salk JJ, Sugiyama KI, Suzuki T, Wills JW, Marchetti F. *Regul Toxicol Pharmacol.* 164, 1059 (2026)
8. Honda H, Suzuki T, Kitajima M, Kondo NI, Miyata K, Utsumi S, Yamada M. The new era shaped by environmental genome monitoring - symposium of the Japanese environmental mutagen and genome society (JEMS), 2024. *Genes Environ.* 2025, 47: 6.
9. Matsumura S, Hosoi S, Hirose T, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Kawade A, Hakura A, Kakiuchi D, Asakura S, Koyama N, Okada Y, Chikura S, Kimoto T, Masumura K, Suzuki T, Sugiyama KI. Whole genome mutagenicity evaluation using Hawk-Seq™ demonstrates high inter-laboratory reproducibility and concordance with the transgenic rodent gene mutation assay. *Genes Environ.* 2025, 47: 13.
10. Error-corrected next generation sequencing (ecNGS) の現状. 鈴木孝昌. 毒性質問箱27号, 50-55 (2025)
11. 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.
12. 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.
13. 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).
14. 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.
15. 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).
 16. 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).
 17. 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, Dolatkhah 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.
 18. 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.
 19. 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).
 20. Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Sato K, Dissook S, Wanibuchi H, Taya S, Wongpoomchai R, Dejkriengkraikul P, Gi M, Yodkeeree 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).
 21. 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.
 22. 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).
 23. 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).
24. 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. 井上薫：有害性評価での科学的に適切な adverse effects 判断に向けて，第 52 回日本毒性学会学術集会，那覇（2025.7）
 2. 井上薫・田原麻衣子・河上強志：家庭用品に使用されるポリヘキサメチレンビグアナイドの長期影響に関する有害性評価，第 62 回全国衛生化学技術協議会年会，高崎（2025.11）
 3. 増村健一，安東朋子，堀端克良，石井雄二，杉山圭一：マウスを用いたアクリルアミドの in vivo 変異原性と次世代に誘発される生殖細胞系列突然変異の解析．第 52 回日本毒性学会学術年会（2025.7）
 4. 吉田愛海，江田侑未，杉山圭一，堀端克良：遺伝情報発現に付随する突然変異誘発と細胞周期の影響．日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（2025.11）
 5. 江田侑未，佐々木沙耶，吉田愛海，杉山圭一，堀端克良：クロマチン画分上の DNA 損傷応答解析を利用した遺伝毒性反応の検出．日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（2025.11）
 6. 松本真理子，磯貴子，馬野高昭，大道友香，広瀬望，若山美智子，増村健一，堀端克良，杉山圭一：グリシジルメタクリレート経口投与による雄 MutaMouse における in vivo 変異原性の検討．日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（2025.11）
 7. 羽倉昌志，須井哉，川上久美子，加藤雅之，皿田巳子，杉山圭一，堀端克良，峯川和之，山本美佳，山田雅巳：TA100 株の感受性の違いについての一考察（BMS pilot study）．日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（2025.11）
 8. グルーズピーター，山田雅巳，堀端克良，杉山圭一：AlkB と触媒活性を欠損した DNA ポリメラーゼ IV が Ames 試験で hisG46 標的の変異誘発に及ぼす影響．日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（2025.11）
 9. 安井学，鵜飼明子，本間正充，杉山圭一；Ames 試験で強い陽性を示す香料物質 6-メトキシキノリンのグルタチオン補充型 TK6 試験によるフォローアップ．日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会、静岡市（2025.11）
 10. M Han, T Matsuda, S Matsuda, Biotransformation of orexin receptor antagonists in activated sludge, 9th International Symposium of the Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society (Kyoto)（2025.12）
 11. S Oka, T Matsuda, S Matsuda, Proposal of

- a quantitative chromatin proteomics-based method for assessing chemical carcinogenicity, 9th International Symposium of the Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society (Kyoto) (2025.12)
12. S Matsuda, Visualization and absolute quantification of the DNA damage responses for chemical genotoxicity assessment, The National Cheng Kung University–Kyoto University Research Exchange Forum: Sustainability and Disaster Prevention (Tainan, Taiwan) (2025.12)
 13. 岡辰太郎、松田知成、松田俊、クロマチン定量プロテオミクス法による化学物質発がん性判別法の提案、日本環境変異原ゲノム学会第54回大会（静岡）（2025.11）
 14. 溝口夏生、松田知成、松田俊、遺伝子治療用ウイルスベクターの環境リスク評価ーメダカ胚細胞を用いたベクターの感染能評価ー、日本環境変異原ゲノム学会第54回大会（静岡）（2025.11）
 15. 吉野純、松田知成、松田俊、遺伝子治療に用いられるアデノ随伴ウイルスベクターのメダカに対する感染リスクの *in vitro* 評価、日本環境変異原ゲノム学会第54回大会（静岡）（2025.11）
 16. 吉野純、松田知成、松田俊、遺伝子治療に用いられるアデノ随伴ウイルスベクターのメダカに対する感染リスクの *in vitro* 評価、京都大学環境衛生工学研究会第47回シンポジウム（京都）（2025.7）
 17. 岡辰太郎、松田知成、松田俊、石川良賀、岡めぐみ、ディーゼル排気微粒子が誘導する突然変異パターンとDNA付加体の解析、京都大学環境衛生工学研究会第47回シンポジウム（京都）（2025.7）
 18. 石井雄二、瀧本憲史、山上洋平、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、渋谷 淳、小川久美子：ラットを用いたカルバミン酸メチルの *in vivo* 遺伝毒性評価。日本食品化学学会第31回総会・学術大会、滋賀（2025.6）
 19. 山上洋平、石井雄二、中村賢志、原島洋文、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、村上智亮、小川久美子：アセトアミド誘発ラット肝腫瘍で見られた染色体外環状DNAの特徴とクロモスリプシスの関与。第52回日本毒性学会学術年会、沖縄（2025.7）
 20. 石井雄二：クロモスリプシスによるラット肝発がん機序の解明。がん予防学術大会2025、名古屋（2025.9）
 21. 相馬明玲、石井雄二、山上洋平、高須伸二、豊田 武士、小川 久美子：アセトアミドの大型小核形成に関わる構造的特徴の検討。第52回日本毒性学会学術年会、沖縄（2025.7）
 22. 山上洋平、石井雄二、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、村上智亮、小川久美子：アセトアミド誘発大型小核によるクロモスリプシス様染色体再構成と肝発がんへの寄与。第54回日本環境変異原ゲノム学会、静岡（2025.11）
 23. 山上洋平、石井雄二、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、村上智亮、小川久美子：アセトアミドのラット肝発がんに寄与する肝細胞質内封入体の形成機構。第

- 42 回日本毒性病理学会, 名古屋 (2026.1)
24. 石井雄二, 山上洋平, 高須伸二, 相馬明玲, 豊田武士, 小川久美子: Acetamide のラット肝発がんに寄与する大型小核の形成機序. 日本薬学会第146年会, 大阪 (2026. 3)
25. 鈴木孝昌, 三島雅之, 笠原杏奈, 最上由香里, 高橋華奈子, 佐藤薫, 杉山圭一. ナノポアシークエンサーを用いた簡便迅速なDNAメチル化解析. 日本環境変異原ゲノム学会第54回大会 (2025.11)
26. 鈴木 孝昌, 三島 雅之, 佐藤 薫, 杉山 圭二, 動物細胞を用いたDNAメチル化検出法の検討, 日本農芸化学会 2026年度大会, 京都市 (2026.3)
27. 最上 由香里, 高橋 華奈子, 鈴木 孝昌, 伊澤 和輝, 三島 雅之, 柳井 修一, 堀端 克良, 小泉 修一, 杉山 圭一, 佐藤 薫, 神経細胞、ミクログリアにおける細胞老化にともなうゲノム変化と表現系の解析, 日本薬理学会第99回年会, 仙台市 (2026.3)
28. 伊澤和輝, 津田雅貴, 諸角涼介, 杉山圭二. ラットサンプルを用いたECS解析による用量反応性の検討. 日本環境変異原ゲノム学会第54回大会 (2025.11)
29. 諸角涼介, 清水直登, 石庭寛子, 井出博, 津田雅貴. ネットアイツメガエルを用いた低線量率放射線によるDNA修復機構依存的影響の解析」日本環境変異原ゲノム学会第54回大会 (2025.11)
30. Ryosuke Morozumi, Naoto Shimizu, Hiroko Ishiniwa, Hiroshi Ide, Masataka Tsuda. Radiation sensitivity dependent on DSB repair mechanism in *Xenopus* embryos. The 68th Annual Meeting of the Japanese Radiation Research (2025.10)
31. 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, 鰐渕英機. 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)
32. Arpamas Vachiraarunwong, Kwanchanok Praseatsook, Rawiwan 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)
33. 郭潤傑, Arpamas Vachiraarunwong, 鈴木周五, 藤岡正喜, Guiyu Qiu, 河村百合菜, 梯アンナ, 鰐渕英機, 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)
34. 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)
35. 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, 鰐渕英機. 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)

36. 鈴木周五, 魏民, 藤岡正喜, 梯アンナ, 鰐
渕英機. 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)

37. 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、鰐渕英機. 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

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし