

## 発がん性評価の歴史と今後の展望

西川秋佳

### History and future perspective of carcinogenicity assessment

Akiyoshi Nishikawa

In this review article, history of carcinogenicity bioassay is briefly surveyed and future perspectives of carcinogenicity assessment are discussed. Carcinogenicity is usually assessed in combination with genotoxic data. However, it remains unknown how much the genotoxicity detected in most cases affects the carcinogenicity in experimental animals. Thus, one of the major issues in the current carcinogenicity assessment is whether any threshold exists for genotoxic carcinogens. Thereby, the *in vivo* reporter gene transgenic models which can simultaneously detect both carcinogenicity and genotoxicity on organ basis may solve this serious issue. In addition, even in definitive genotoxic carcinogens, it may be possible to assess them by the margin of exposure based on the existence of biological thresholds. Another major issue is the extrapolation of the animal data to human risk. For the solution, current approaches of the weight of evidence based on the mode of action may be very useful. For example, the studies using the transgenic rodents such as *p53*-, *nrf2*- or CAR- knockout mouse would be helpful to elucidate carcinogenic mechanism. As other issues related to the animal welfare movement and the need to assess carcinogenicity of a number of chemicals, it is urgent to develop quick and simplified test methods. Thus, *in silico* and *in vitro* approaches are expected as strong tools to screen genotoxicity and carcinogenicity.

Keywords: carcinogenicity assessment, perspective, threshold, extrapolation to human, 3Rs

#### 1. はじめに

がんは日本人の死因の第一位を占め、最も対策が急がれる疾患であるが、長年にわたる研究にもかかわらず、増加を続けている。その増加の要因として高齢化との関連が指摘されているが、遺伝的要因による腫瘍性疾患を除けば、一般のがんの発生メカニズムは十分に解明されているとは言えない。解明が進んでいるメカニズムには、感染症による炎症性疾患が知られている。たとえば、肝炎ウイルスによる肝細胞がん、ヘリコバクター・ピロリ菌による胃がん、パピローマウイルスによる子宮頸がんなどが挙げられる<sup>1)</sup>。このような感染症に加えて、疫学

的調査ではがん全般に関して、喫煙を含む生活習慣に係わる要因の占める割合が大きいとする報告が多い<sup>2)</sup>。

それに対して、化学物質が要因となる割合はかなり小さいまたは不明と言わざるを得ない。しかし、化学物質の高濃度曝露による特定のがんの発生が散発的に報告されている。最近では、印刷事業場における胆管がん<sup>3,4)</sup>や染料中間体製造事業場における膀胱がん<sup>5)</sup>の集中的な発生が話題になったばかりである。過去のアスベストの曝露による中皮腫および肺がんの発生は今後も増加することが指摘されている<sup>6)</sup>。また、種々の要因の複合影響により、化学物質の曝露が発がん過程を促進している可能性は否定できない。現在、医薬品、食品添加物、農薬、環境化学物質を含む化学物質の発がん性は、主にげっ歯類を用いるがん原性試験によって評価されているが、ここ数年の研究の進展や3Rsの普及による試験方法および評価方法の大きな変革が予想される。本稿では、各種化学物質の発がん性評価に関する現在の主要な課題を考察し、問題を解決するためのいくつかのアプローチを提案する。

To whom correspondence should be addressed:

Akiyoshi Nishikawa; Director of Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki City, Kanagawa 210-9501, Japan; Tel +81-44-270-6604; Fax +81-44-270-6605; E-mail: nishikaw@nihs.go.jp

## 2. がん原性試験の歴史

1775年にパーシヴァル・ポットは、ロンドンの煙突掃除人に陰嚢がんの多いことを報告し、その原因が煤であると推論した<sup>7)</sup>。これが化学物質による発がん性を示唆した最初の研究とされる。その後1915年に、山極勝三郎と市川厚一はコールタールをウサギの耳に長期間塗擦することにより、世界で初めて実験的に腫瘍を発生させた<sup>8)</sup>。1932年には、吉田富三がアゾ色素オルト・アミドアゾトルオールを経口投与により、ラットに肝臓がんを誘発させた<sup>9)</sup>。このような、研究成果の積み重ねを背景として、ラットやマウスを主とするげっ歯類に化学物質を長期間投与して腫瘍の発生状況を病理組織学的に検索する現在のがん原性試験法が確立されるに至った。

発がん性は化学物質による最も重大な有害影響の1つであるため、ヒトの健康をがんの発症から防ぐためにはより精度の高い評価が必要である。これまでに多くの化学物質がげっ歯類に発がん性を有することが知られている<sup>10)</sup>。ラットおよびマウスは短命で体のサイズが小さいが、ヒトと同様に哺乳類であるために、一般的に長期がん原性試験に使用され、その結果は基本的に発がん性が陽性か否かとして評価される。以前は、ヒトまたは動物試験でがんを誘発することが判明した化学物質は原則として使用が禁止され、これに関連する法律は米国でDelaney条項と呼ばれていた。しかし、発がん物質に関する科学的知見が蓄積されてきた結果、発がん性のリスクはそれぞれの化学物質の発がん性の強度と曝露レベルによって決まると評価されることになり、Delaney条項は1996年に廃止された<sup>11)</sup>。

1961年に経済成長、貿易自由化および途上国支援に貢献することを目的とするOECD（経済協力開発機構）が発足し、我が国は1964年に加盟した。OECD試験法ガイドライン（TG）は、農薬および工業用化学物質を含む広範囲の化学物質の試験に用いられるように計画されている。OECDのTG 451「がん原性試験」の初版は1981年に採択されたが、動物愛護と規制要件の変化を反映するため、改定版の作成が必要と考えられ、2009年のTG 451の改定は試験に用いた動物から更なる情報を得ることと、用量設定に関する記載をより充実させることを目的として、TG 452「慢性毒性試験」およびTG 453「慢性毒性／がん原性併合試験」の改定と並行して行われた<sup>12-14)</sup>。

1965年のWHO（世界保健機関）の総会で、発がんのメカニズム、疫学、予防等の研究組織としてIARC（国際がん研究機関）が設立された。IARCによると、環境化学物質および医薬品は発がん性の観点から4つのグループに分類される<sup>10)</sup>。グループ1は発がん性あり、2Aはおそらく発がん性あり、2Bは発がん性の可能性あ

り、3は発がん性に関しては分類できない、4はおそらくヒトに対して発がん性なしを意味する<sup>10)</sup>。これまでにIARCで評価された1003種類の化学物質および医薬品のうち、120（12%）、81（8%）および299（30%）がそれぞれグループ1、2Aおよび2Bと判定されている。

1978年に米国では、毒性物質、特に発がん物質に関する科学的知識の蓄積や試験方法の開発・改良とともに、潜在的にリスクのある化学物質の情報を公的機関、アカデミアおよび一般国民に提供する目的で省庁横断的プログラムであるNational Toxicology Program (NTP)が成立した。これは当時の米国において環境中の化学物質によるヒトへの有害影響の懸念が増していたためである。現在までに、590を超える物質が試験され、570を超える物質が評価されている<sup>15)</sup>。同じ年に、当安全性生物試験研究センターが設立されたのは時代の要請を反映したものとと言える。

1990年に、グローバル化する医薬品開発・規制・流通等に対応するため、ICH（医薬品規制調和国際会議）が創設された。ICHの使命は、限られた資源を有効に活用しつつ安全性・有効性及び品質の高い医薬品が確実に開発され上市されるように、よりグローバルな規制調和を目指すことである。発足当初のがん原性試験は、他の化学物質と同様に、原則としてラットおよびマウスの長期試験が必須とされていた。しかし、1998年の改定で、ラットの長期試験は原則必須であるが、マウスの長期試験に代えて、高感受性トランスジェニックマウスや二段階ラットモデルを用いた中期試験なども容認されている<sup>16)</sup>。

## 3. 発がん性評価の現状

### 3-1 食品関連物質

食品に含まれる化学物質は、主に意図されたものとそうでないものの2つに分類される。食品添加物および残留農薬は前者であり、汚染物質は後者である。現在のリスク評価では、発がん性物質は遺伝毒性データに基づいて遺伝毒性物質と非遺伝毒性物質に分類される。遺伝毒性は数理的に線形であり、したがって閾値はないと考えられるため、食品中の意図された化学物質は基本的に遺伝毒性を有するべきではないとされている。しかるに、遺伝毒性のない食品添加物や農薬は、一般には閾値を前提としたNOAEL（無毒性量）に基づくADI（一日摂取許容量）で評価される。一方、汚染物質については、遺伝毒性発がん物質であっても、意図されずに存在することから環境中から完全には排除されないため、閾値以外の方法で評価される。このように、避けられない遺伝毒性発がん物質には、ALARA（合理的に達成可能な原理）またはVSD（実質安全量）が適用されてきた。最近では、TTC（毒物学的懸念の閾値）<sup>17-25)</sup>やMOE（曝露マージ

ン)<sup>25-27)</sup>などの閾値を問わないアプローチが意図された化学物質および意図されない化学物質の両方に導入されはじめている。なお、遺伝毒性は一般的には閾値がないとされているが、実際には個々の化学物質の遺伝毒性に閾値が存在するかどうかは不明である<sup>28-31)</sup>。

### 3-1-1 汚染物質／化学物質

アクリルアミド、ヘテロサイクリックアミン類およびニトロソアミン類は、加熱調理過程においてまたは摂取後の胃内において副生成物として生成し、IARCのグループ2Aまたは2Bに分類される遺伝毒性発がん物質である。強力な突然変異誘発性を示すアフラトキシンB1を含むアフラトキシン類は、げっ歯類に対するよく知られた肝発がん物質であり、IARCグループ1に分類されている。もう一つのマイコトキシンであるオクラトキシンAは、げっ歯類において腎臓の腫瘍を誘発するが、遺伝毒性の役割は不明であった。しかし、最近我々はオクラトキシンAの*in vivo*での遺伝毒性を*gpt delta*ラットの腎臓において検出した<sup>32,33)</sup>。

### 3-1-2 天然植物成分

天然植物の構成成分であるサフロールおよび分解生成物ヒドラジンなどは、遺伝毒性に加えてげっ歯類に腫瘍を誘発することが知られている<sup>34-36)</sup>。我々の最近の研究で、サフロールは*gpt delta*ラットの肝臓において遺伝毒性を示すことが確認された<sup>37)</sup>。

### 3-1-3 食品添加物

既存添加物のうち、発がん性の懸念があるものについて、厚生労働省によりがん原性試験が実施されてきた。Rubia tinctorum（アカネ）の根から抽出したアカネ色素は、日本の食用着色料として使用されていたが、我々が実施したアカネ色素の104週間混餌投与がん原性試験において、雌雄のF344ラットに腎細胞がんおよび肝細胞がんが有意に発生増加した。現在のIARC分類は依然としてグループ3のままであるが、その強い遺伝毒性と併せてこの発がん性のデータのために、アカネ色素は2004年に使用することが禁じられた<sup>38)</sup>。その後の詳細な研究により、アカネ色素成分の代謝物であるルビアジン等が発がん性の主要な役割を果たす可能性が示唆されている<sup>39)</sup>。

臭素酸カリウムは、主に製パンの過程において食品添加物として使用される酸化剤であるが、ラットにおいて腎細胞腫瘍を誘発する<sup>40-43)</sup>。ラット腎発がん過程のイニシエーションおよびプロモーションの両活性を有し、発がん性はマウスおよびハムスターにおけるよりもラットで強い。また、細菌類における弱い遺伝毒性とは対照的

に、比較的強い染色体異常を誘発する。臭素酸カリウムから生成された活性酸素ラジカルがラット腎臓において8-ヒドロキシデオキシグアノシンを生成し、その結果として毒性および発がん作用に関与する可能性が示唆されている<sup>44)</sup>。現時点では、残留しないという条件の下で、その限定された使用が認められている。

### 3-1-4 残留農薬

有機リン系、有機塩素系、カルバメート系、ピレスロイド系などの主要なグループの農薬は、げっ歯類において発がん性があると報告されている場合もあるが<sup>45)</sup>、生体において懸念すべき遺伝毒性がないという根拠に基づいて、その使用が認められている。最近では、類似の化学構造式を持つキャプタンおよびホルベットが発がん性を有し、マウスに十二指腸がんを誘発することが議論的になったが、その後のトランスジェニックマウスによる試験およびコメットアッセイで陰性の結果が得られたため、生体において懸念すべき遺伝毒性はないとされた<sup>46,47)</sup>。

### 3-2 医薬品

抗がん剤や免疫抑制剤には発がん性を有するものが知られているが、そのリスク・ベネフィットの関係から使用が容認されている。それ以外の医薬品でも、下剤として長年にわたって使用されてきたフェノールフタレインがラットにおける発がん性により、現在は一般用医薬品としての使用が禁止されている<sup>48)</sup>。

### 3-3 化学物質

労働現場において懸念すべき化学物質については、厚生労働省によりこれまで55の化学物質の吸入または経口でのがん原性試験が実施されてきた。一方、2009年の化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）の改正により、これまでのハザード評価からリスク評価に移行し、リスク評価の段階でがん原性試験を要求される可能性があるがまだその事例はない。

## 4. 発がん性評価に関する課題

### 4-1 閾値に関する課題

発がん性および遺伝毒性を考慮して、化学物質は4つの異なるカテゴリー、すなわち、遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性非発がん物質および非遺伝毒性非発がん物質に分類できる。この分類に基づいて、遺伝毒性および非遺伝毒性の発がん物質は現在のリスク評価手順においてはそれぞれ閾値なしおよび閾値ありとされる。しかし、発がん性試験と遺伝毒性試験は基本的に互いに独立しており、検出された潜在的な遺伝毒

性が発がん性にどのくらい寄与しているか不明であることが多い。試験法の限られた発がん性試験とは対照的に、遺伝毒性評価のための多くの試験法があるが、OECDは最近、遺伝毒性に関する試験ガイドラインを改定した<sup>49)</sup>。遺伝毒性は、直接的DNA損傷（主にエームス試験で評価される）と染色体異常（マウス小核試験を含む）の2つの異なるカテゴリーに大別される。これらに加えて、ラット肝小核試験<sup>50,51)</sup>、*in vivo*コメットアッセイ<sup>52)</sup>およびレポーター遺伝子を有するトランスジェニックげっ歯類試験<sup>53,54)</sup>が最近開発されている。*in vivo*での遺伝毒性試験は、発がん標的組織における遺伝毒性を評価する有望な試験方法であることから、広範な検証が行われている<sup>55)</sup>。なお最近では、遺伝毒性のうち、小核試験における染色体異常についても*in vivo*での閾値が示唆されており<sup>28-31)</sup>、閾値の存在は遺伝毒性データの総合評価により決定されるため、遺伝毒性および発がん性のメカニズムに関する全般的な理解が発がん性の評価にとって重要である。

#### 4.2 ヒトへの外挿性に関する課題

ヒトの発がんリスクに対する動物データの外挿性に関しては、ほとんどの場合完全には科学的に解明されているとは言えない現状がある。肝臓、腎臓、膀胱、前胃、甲状腺、乳腺、子宮、精巣、副腎、卵巣および睪嚢には、比較的げっ歯類に腫瘍性病変が発生しやすいと報告されているが<sup>56,57)</sup>、雄ラットに特異的な $\alpha_{2u}$ グロブリン関連腎発がんを除いて、種特異性を明確にするためにはMOA（作用様式）を用いた詳細な解析が必要である。

#### 4.3 試験法に関する課題

現在、食品添加物および農薬に対しては、ラットおよびマウスの両方を用いたがん原性試験が種特異性を確認するために必要とされている。一方、前述したように、医薬品については、現在のガイドラインでは原則としてラットの長期試験が必須であるが、長期間のマウスの試験は遺伝子改変マウスを用いた中期発がん性試験<sup>58-66)</sup>やイニシエーション・プロモーション二段階ラット肝中期発がん性試験<sup>67-70)</sup>などが代替法として容認されている。さらに、最近のICHでは、十分な科学的根拠がある場合には、ラットの試験さえも免除できる可能性があるかについて前向き評価により検討している。医薬品の場合はヒトで完全にフォローアップできるが、食品の場合はそうでない点が大きく異なる。しかし、この傾向は動物愛護の動きに連動して、食品関連物質の発がん性評価にも多かれ少なかれ影響することが予想される。さらに、発がん性を試験すべき化学物質が膨大な数に上っている現実があり、長期間を要するがん原性試験で全てをまか

なうことは不可能であることから、*in vitro*ないしは*in silico*モデルによるスクリーニング試験の開発は急務と言える。

### 5. 今後の展望

#### 5-1 閾値の課題に対する展望

遺伝毒性発がん物質にも閾値があるかもしれないという重大な点について、いくつかの可能性が示唆されている。第1に、*in vitro*と*in vivo*の試験間や単回投与と反復投与の*in vivo*試験間の齟齬から判断して、誤った遺伝毒性陽性成績（すなわち偽陽性）が存在する可能性がある。第2に、検出された遺伝毒性がげっ歯類における長期試験で見出される発がん性にどの程度寄与しているかは実際には不明であり、全く寄与していない可能性もある。これを究明することは発がん臓器の違い、動物種差、雌雄差等を理解する上で重要なポイントになる。第3に、発がん過程自体が、代謝活性化、DNA損傷／修復、遺伝子突然変異、アポトーシス、細胞増殖および免疫抑制などの多段階であることがよく知られており、これらのステップのそれぞれに閾値機構がある場合、化学物質が発がん性を示す上で生物学的閾値を有する可能性は十分にある。最も単純化した発がん仮説であっても、発がん性の完結には遺伝毒性あるいは非遺伝毒性（またはエピジェネティックな事象）の両方が必要であり、そのことは非遺伝毒性事象で決定される閾値の可能性を示唆する。要するに、発がん性の開始が直接的なDNA反応に基づいているか、遺伝毒性が発がん性にどれくらい寄与しているか、または発がん性がヒトのリスクにも当てはまるかどうかを確認するためには、発がん性のメカニズム解明が重要なことは自明である。そのためには、後述する我々が開発したレポーター遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性・発がん性併合試験は有力なツールとなる。また、OECDで進められているAOP（有害性発現経路）やIATA（試験法・評価法統合アプローチ）は、今後の発がん性評価にも大きく寄与する可能性がある<sup>71)</sup>。

#### 5-2 動物種差の課題に対する展望

閾値の問題とは別に、動物のデータをヒトのリスクに外挿することにおけるもう一つの大きな課題がある。IARCの評価では、動物の標的器官がヒトと必ずしも同じではないことが明記されている<sup>10)</sup>。WHOのIPCSおよびILSI / HESIのプロジェクトでは、いくつかの化学物質がWOE（根拠の重み）アプローチを用いて評価されている。例えば、腎腫瘍を誘発するリモネンのMOAは、原因となる $\alpha_{2u}$ グロブリンが雄ラットにのみ存在するため、ヒトのリスクとは質的に関連しないと結論付けている<sup>72,73)</sup>。一部の非遺伝毒性物質によって誘発される肝腫

瘍は、構成的アンドロスタン受容体 (CAR)、プレグナンX受容体 (PXR) およびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR $\alpha$ ) 関連遺伝子などの転写因子に単純に関連するMOAに基づく場合、ヒトのリスクとは量的には関連性が乏しいと考えられる<sup>74,75</sup>。酸化的DNA損傷のような二次的な遺伝毒性はヒトにも外挿しうるが、炎症や細胞毒性のような1次的な事象には閾値が想定できる可能性が高い<sup>28,76,77</sup>。要するに、どの腫瘍がげっ歯類特異的な発がんメカニズムに基づいているかを質的または量的に明らかにすることが非常に重要である。そのため、CARなどの転写因子の他にも、酸化ストレス応答転写因子*nrf2*やがん抑制遺伝子*p53*を欠損したマウスは、それぞれの機能解析に大きな役割を果たすことが期待される。

### 5-3 提案される試験法

#### 5-3-1 *In silico*モデル

QSAR (定量的構造活性相関) に基づくいくつかの*in silico*モデルが、医薬品および工業用化学物質の遺伝毒性評価において開発されている<sup>78-85</sup>。このような*in silico*モデルが医薬品不純物の国際的な規制評価においてどのように使用されているかを確認するために、ガイドラインで推奨されているあるいは様々な規制当局や他の既存のプログラムによって実際に使用されている統計ベースおよび知識ベース (エキスパートシステム) のQSARが調査された<sup>78</sup>。結果として、遺伝毒性および発がん性の予測のために利用可能な*in silico*ツールは有効であり、QSAR法の規制適用の範囲は増加しつつあることが判明した。規制上の理由から、遺伝毒性および発がん性の予測は、高感度モデル (低偽陰性率) と高特異性モデル (低偽陽性率) を組み合わせたバッテリーに基づいて行うことが推奨されている。最近、遺伝毒性の他に非遺伝毒性の発がん性をスクリーニングするための*in silico*ツールもいくつか考案されている<sup>86</sup>。

#### 5-3-2 *in vitro* 細胞形質転換試験

v-Ha-*ras*遺伝子<sup>87-92</sup>でトランスフェクトされたSwissマウス細胞から樹立されたBhas 42細胞を用いて、化学物質の発がんプロモーション活性を検出するための短期間の細胞形質転換試験が開発されている。プロモーション活性を検出するBhas 42細胞の感受性は、低用量の3-メチルコラントレンで処理された2段階BALB/c 3T3細胞形質転換試験の感度と同等であった<sup>89</sup>。Bhas 42細胞形質転換試験は、コストおよび労力において古典的なBALB/c 3T3細胞形質転換試験よりも優れており、OECDのガイダンスドキュメント<sup>93</sup>として収載されている。Bhas 42試験の他にも、シリアンハムスターの胎児

細胞を用いるSHE細胞形質転換試験も良好な試験成績が得られていることから<sup>94</sup>、同様にOECDガイダンスドキュメント<sup>95</sup>に記載された。最近では、マウスES細胞を用いたTox Trackerアッセイが遺伝毒性および非遺伝毒性双方の発がん物質を効率に検出可能であることが報告された<sup>96</sup>。

#### 5-3-3 トキシコジェノミクス

化学物質の潜在的発がん性の早期評価のための遺伝子発現ベースの予測モデルは、トキシコジェノミクスデータベースを用いて主にラットで開発されている<sup>97-101</sup>。肝発がん性に限定すれば、その予測精度は十分に高く、偽陽性はほぼ完全に排除できるとの報告もある<sup>99</sup>。興味深いことに、いくつかの遺伝毒性および非遺伝毒性の発がん物質について、同じくらいの高い予測率が得られており、遺伝毒性および非遺伝毒性発がん物質の発がん初期の選択された候補バイオマーカー遺伝子の発現プロファイルが共通の特徴を持つ可能性が示唆されている。このようなトキシコジェノミクスモデルは、化学物質の発がん性のスクリーニングと発がん性試験実施のための優先順位付けに有用であろう<sup>99</sup>。しかし、肝臓以外の標的臓器をどのようにして特定するかが解決すべき更なる課題と言えそうである。なお、予測精度をさらに向上させるために、エピジェネティクスのマーカーを加えた取り組みも始まりつつある。

#### 5-3-4 レポーター遺伝子導入動物モデル

Muta<sup>TM</sup>マウス、Big Blueマウス、*gpt delta*ラットおよびマウスなどのトランスジェニックげっ歯類を用いた突然変異試験法に関するガイドラインがOECDから公表されている<sup>53</sup>。これらの中で、*gpt delta*マウスは当所変異遺伝部 (能美健彦前変異遺伝部長) において、 $\lambda$ EG10ファージDNAをC57BL / 6Jマウスの受精卵にマイクロインジェクションすることによって樹立された<sup>54,102</sup>。さらに、Sprague-Dawleyラット<sup>103</sup>および戻し交配したF344ラット<sup>104</sup>やWistar Hannoverラットにおいて*gpt delta*ラットが同様に開発されている。*gpt delta*マウスまたはラットの突然変異は、主に点突然変異および欠失にそれぞれ応答する6-チオグアニン選択およびSpi<sup>-</sup>選択を用いて評価することができる<sup>105</sup>。

*gpt delta*モデルが同一臓器において遺伝毒性と発がん性の両方を評価可能であることから<sup>106,107</sup>、発がん性の閾値の問題を明らかにするために、発がん性物質によって腫瘍が誘発された組織における*in vivo*遺伝毒性を*gpt delta*げっ歯類を用いて調べた結果<sup>106-123</sup>、いくつかの遺伝毒性発がん物質は発がん標的臓器である肝臓で顕著な遺伝毒性を示した<sup>122</sup>。対照的に、遺伝毒性のある水

道水塩素処理塩素副産生成物であるMXは*gpt delta*マウスで*in vivo*遺伝毒性および発がん性を示さなかった<sup>121)</sup>。一方、既知の非遺伝毒性発がん性ジシクラニルは、発がん性の性特異性と一致する形で、雌マウスの*in vivo*遺伝毒性ならびに酸化DNA損傷を増加させたが、直接DNA反応性の明らかな証拠は示されなかった<sup>119)</sup>。オクラトキシンAは、げっ歯類において腎腫瘍を誘発することは十分に立証されているが、腎発がんに対する遺伝毒性の関与は明らかにされていなかった。しかし、我々の実験では、オクラトキシンAを投与した*gpt delta*ラットでは腎臓の髄質外帯において顕著な遺伝毒性が検出された<sup>33)</sup>。*gpt delta*ラットは、野生型ラットと同様の発がん性感受性を示すことも確認されており、このようなトランスジェニックげっ歯類モデルを用いた亜慢性毒性/*in vivo*遺伝毒性併合試験は遺伝毒性発がん物質を検出するための短時間で高精度な動物試験として提案される。臓器レベルでの*in vivo*遺伝毒性の可能性を検出するための追加的なアプローチの観点から、我々の提案する併合試験法は亜慢性毒性試験を単に敷衍するだけの試験法<sup>124)</sup>よりも有望である可能性が高い。さらに、発がん中期検索モデルに加えて、臓器標的性が予測可能な場合には、肝臓または腎臓を標的とする発がん性短期検索モデルを用いる価値は大きいと言える<sup>125,126)</sup>。

## 6. おわりに

現行の発がん性評価においては、2つの主要な課題といくつかの小さな課題がある。主要な課題の1つは、遺伝毒性発がん物質の閾値に関するものであり、腫瘍性病変が発現した標的器官に遺伝毒性が実際に関与しているかどうかを明らかにするためには、*gpt delta*のようなレポーター遺伝子を有するトランスジェニック動物が有用であり得る。また、*in vivo*での遺伝毒性が陽性であっても、多段階の発がん過程における代謝活性化、細胞増殖、アポトーシス、免疫抑制などの重要な事象のなかにはそれぞれに生物学的な閾値を想定できる可能性がある。もう1つの大きな課題は、ヒトのリスクに対する動物データの外挿に関する点であり、発生増加した腫瘍性病変の種特異性を明らかにするために、MOAに基づくWOEアプローチは非常に有用である。そのために、*p53*、*nrf2*またはCARノックアウトマウスのようなトランスジェニック動物は発がんメカニズムを解明するのに役立つはずである。将来的には、*in silico*および*in vitro*アプローチは、多数の化学物質/医薬品の遺伝毒性および発がん性をスクリーニングするための強力なツールと期待される。確実に3Rsが進む現在、OECDで進められているAOPやIATAの早期の公定化が望まれるが、特に発がん性評価に関する期待は大きいと言える。今後の発がん性

評価は、迅速化と精緻化（テイルメイド化を含む）の相反する二方向に向かうものと予想される。

## 引用文献

- 1) Shin HR, Shin A, Woo H, *et al.*: Prevention of infection-related cancers in the WHO Western Pacific Region. *Jpn J Clin Oncol.* 2016; 46: 13-22.
- 2) Akinyemiju T, Ogunsina K, Okwali M, *et al.*: Lifecourse socioeconomic status and cancer-related risk factors: Analysis of the WHO study on global ageing and adult health (SAGE). *Int J Cancer.* 2017; 140: 777-87.
- 3) Kumagai S, Sobue T, Makiuchi T, *et al.*: Relationship between cumulative exposure to 1,2-dichloropropane and incidence risk of cholangiocarcinoma among offset printing workers. *Occup Environ Med.* 2016; 73: 545-52.
- 4) Kumagai S, Kurumatani N, Arimoto A, *et al.*: Cholangiocarcinoma among offset colour proof-printing workers exposed to 1,2-dichloropropane and/or dichloromethane. *Occup Environ Med.* 2013; 70: 508-10.
- 5) 厚生労働省「芳香族アミン取扱事業場で発生した膀胱がんの業務上外に関する検討会（座長 柳澤裕之）」報告書（平成28年12月21日）
- 6) 厚生労働省「都道府県（21大都市再掲）別にみた中皮腫による死亡数の年次推移（平成7年～26年）」（平成27年9月3日）
- 7) Kipling MD, Usherwood R, Varley R: A monstrous growth: An historical note on carcinoma of the scrotum. *British Journal of Industrial Medicine.* 1970; 27: 382-4.
- 8) Yamagiwa K, Ichikawa K: Über die künstliche Erzeugung von Papillom. *Verh Jap Path Ges.* 1915; 5: 142-8.
- 9) 吉田富三: O. Amidoazotoluolの飼与による肝細胞癌 (Hepatoma) の人工的発生. *東京医学会雑誌.* 1932; 46: 2398-400.
- 10) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2017). <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
- 11) Merrill RA: Food safety regulation: reforming the Delaney Clause. *Annu Rev Public Health.* 1997; 18: 313-40.
- 12) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 Health Effects Test No.451: Carcinogenicity Studies (2009).

- 13) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 Health Effects Test No.452: Chronic Toxicity Studies (2009).
- 14) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 Health Effects Test No.453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies (2009).
- 15) National Toxicology Program, Technical Reports Index (2017).
- 16) ICH Harmonised Tripartite Guideline. Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals (1997).
- 17) Kroes R, Renwick AG, Feron V, *et al.*: Application of the threshold of toxicological concern (TTC) to the safety evaluation of cosmetic ingredients. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45: 2533–62.
- 18) Kroes R, Kleiner J, Renwick A: The threshold of toxicological concern concept in risk assessment. *Toxicol Sci.* 2005; 86: 226–30.
- 19) Kroes R, Renwick AG, Cheeseman M, *et al.*: European branch of the International Life Sciences Institute. Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42: 65–83.
- 20) Kroes R, Kozianowski G: Threshold of toxicological concern (TTC) in food safety assessment. *Toxicol Lett.* 2002; 127: 43–6.
- 21) Kroes R, Galli C, Munro I, *et al.*: Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: a practical tool for assessing the need for toxicity testing. *Food Chem Toxicol.* 2000; 38: 255–312.
- 22) Barlow S, Renwick AG, Kleiner J, *et al.*: Risk assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic report of an International Conference organized by EFSA and WHO with support of ILSI Europe. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44: 1636–50.
- 23) Dybing E, O'Brien J, Renwick AG, *et al.*: Risk assessment of dietary exposures to compounds that are genotoxic and carcinogenic—an overview. *Toxicol Lett.* 2008; 180: 110–7.
- 24) O'Brien J, Renwick AG, Constable A, *et al.*: Approaches to the risk assessment of genotoxic carcinogens in food: a critical appraisal. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44: 1613–35.
- 25) European Commission: Risk assessment methodologies and approaches for genotoxic and carcinogenic substances. *Health and Consumer Protection.* 2009; 1-47.
- 26) Boobis A, Flari V, Gosling JP, *et al.*: Interpretation of the margin of exposure for genotoxic carcinogens - Elicitation of expert knowledge about the form of the dose response curve at human relevant exposures. *Food Chem Toxicol.* 2013; 57: 106–18.
- 27) Benford D, Bolger PM, Carthew P, *et al.*: Application of the Margin of Exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48 (Suppl 1): S2–S24.
- 28) Platel A, Nessler F, Gervais V, *et al.*: Study of oxidative DNA damage in TK6 human lymphoblastoid cells by use of the thymidine kinase gene-mutation assay and the *in vitro* modified comet assay: determination of No-Observed-Genotoxic-Effect-Levels. *Mutat Res.* 2011; 726: 151–9.
- 29) Elhajouji A, Lukamowicz M, Cammerer Z, *et al.*: Potential thresholds for genotoxic effects by micronucleus scoring. *Mutagenesis.* 2011; 26: 199–204.
- 30) Johnson GE, Doak SH, Griffiths SM, *et al.*: Non-linear dose-response of DNA-reactive genotoxins: recommendations for data analysis. *Mutat Res.* 2009; 678: 95–100.
- 31) Gocke E, Müller L: *In vivo* studies in the mouse to define a threshold for the genotoxicity of EMS and ENU. *Mutat Res.* 2009; 678: 101–7.
- 32) Hibi D, Kijima A, Kuroda K, *et al.*: Molecular mechanisms underlying ochratoxin A-induced genotoxicity: global gene expression analysis suggests induction of DNA double-strand breaks and cell cycle progression. *J Toxicol Sci.* 2013; 38: 57–69.
- 33) Hibi D, Suzuki Y, Ishii Y, *et al.*: Site-specific *in vivo* mutagenicity in the kidney of *gpt* delta rats given a carcinogenic dose of ochratoxin A. *Toxicol Sci.* 2011; 122: 406–14.
- 34) Wislocki PG, Miller EC, Miller JA, *et al.*: Carcinogenic and mutagenic activities of safrole, 1'-hydroxysafrole, and some known or possible metabolites. *Cancer Res.* 1977; 37: 1883–91.
- 35) Roe FJ, Grant GA, Millican DM: Carcinogenicity of hydrazine and 1,1-dimethylhydrazine for

- mouse lung. *Nature*. 1967; 216: 375-6.
- 36) Epstein SS, Andrea J, Jaffe H, *et al.*: Carcinogenicity of the herbicide maleic hydrazide. *Nature*. 1967; 215: 1388-90.
- 37) Jin M, Kijima A, Suzuki Y, *et al.*: Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with *gpt* delta rats. *Toxicology*. 2011; 290: 312-21.
- 38) Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, *et al.*: Carcinogenic potential of alizarin and rubiadin, components of madder color, in a rat medium-term multi-organ bioassay. *Cancer Sci*. 2009; 100: 2261-7.
- 39) Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, *et al.*: Induction of kidney and liver cancers by the natural food additive madder color in a two-year rat carcinogenicity study. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47: 184-91.
- 40) DeAngelo AB, George MH, Kilburn SR, *et al.*: Carcinogenicity of potassium bromate administered in the drinking water to male B6C3F1 mice and F344/N rats. *Toxicol Pathol*. 1998; 26: 587-94.
- 41) Kurokawa Y, Takayama S, Konishi Y, *et al.*: Long-term in vivo carcinogenicity tests of potassium bromate, sodium hypochlorite, and sodium chlorite conducted in Japan. *Environ Health Perspect*. 1986; 69: 221-35.
- 42) Kurokawa Y, Aoki S, Matsushima Y, *et al.*: Dose-response studies on the carcinogenicity of potassium bromate in F344 rats after long-term oral administration. *J Natl Cancer Inst*. 1986; 77: 977-82.
- 43) Kurokawa Y, Hayashi Y, Maekawa A, *et al.*: Carcinogenicity of potassium bromate administered orally to F344 rats. *J Natl Cancer Inst*. 1983; 71: 965-72.
- 44) Sai K, Uchiyama S, Ohno Y, *et al.*: Generation of active oxygen species *in vitro* by the interaction of potassium bromate with rat kidney cell. *Carcinogenesis*. 1992; 13: 333-9.
- 45) George J, Shukla Y: Pesticides and cancer: insights into toxicoproteomic-based findings. *J Proteomics*. 2011; 74: 2713-22.
- 46) Food Safety Commission: Risk assessment report, Captan (Pesticide), *Food safety*. 2017; 5: 61-6.
- 47) Food Safety Commission: Risk assessment report, Folpet (Pesticide), *Food safety*. 2017; 5: 67-71.
- 48) Dunnick JK, Hailey JR: Phenolphthalein exposure causes multiple carcinogenic effects in experimental model systems. *Cancer Res*. 1996; 56: 4922-6.
- 49) 本間正充, 森田健: OECD遺伝毒性試験ガイドラインの改訂. 国立医薬品食品衛生研究所報告 2016; 134: 22-32.
- 50) Suzuki H, Ikeda N, Kobayashi K, *et al.*: Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats. A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Mutat Res*. 2005; 583: 133-45.
- 51) Suzuki H, Shirotori T, Hayashi M: A liver micronucleus assay using young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation. *Cytogenet Genome Res*. 2004; 104: 299-303.
- 52) Ding W, Petibone DM, Latendresse JR, *et al.*: *In vivo* genotoxicity of furan in F344 rats at cancer bioassay doses. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012; 261: 164-71.
- 53) OECD 2011. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assays (TG488).
- 54) Nohmi T, Katoh M, Suzuki H, *et al.*: A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi<sup>-</sup> and 6-thioguanine selections. *Environ Mol Mutagen*. 1996; 28: 465-70.
- 55) EFSA Scientific Committee Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment, *EFSA Journal* 2011; 9: 2379 [69 pp.].
- 56) Alison RH, Capen CC, Prentice DE: Neoplastic lesions of questionable significance to humans. *Toxicol Pathol*. 1994; 22: 179-86.
- 57) Gopinath C: The predictive value of pathological findings in animal toxicity studies. *J Toxicol Pathol*. 1995; 8: 89-100.
- 58) Mitsumori K: Evaluation on carcinogenicity of chemicals using transgenic mice. *Toxicology*. 2002; 181-182: 241-4.
- 59) Storer RD, French JE, Donehower LA, *et al.*: Transgenic tumor models for carcinogen



- identification: the heterozygous Trp53-deficient and RasH2 mouse lines. *Mutat Res.* 2003; 540: 165-76.
- 60) Mitsumori K: Possible mechanism on enhanced carcinogenesis of genotoxic carcinogens and unsolved mechanisms on lesser carcinogenic susceptibility to some carcinogens in rasH2 mice. *J Toxicol Sci.* 2003; 28: 371-83.
- 61) Maruyama C, Tomisawa M, Wakana S, *et al.*: Overexpression of human H-ras transgene is responsible for tumors induced by chemical carcinogens in mice. *Oncol Rep.* 2001; 8: 233-7.
- 62) Maronpot RR, Mitsumori K, Mann P, *et al.*: Interlaboratory comparison of the CB6F1-Tg rasH2 rapid carcinogenicity testing model. *Toxicology.* 2000; 146: 149-59.
- 63) Mitsumori K, Koizumi H, Nomura T, *et al.*: Pathological features of spontaneous and induced tumors in transgenic mice carrying a human prototype c-Ha-ras gene used for six-month carcinogenicity studies. *Toxicol Pathol.* 1998; 26: 520-31.
- 64) Yamamoto S, Urano K, Koizumi H, *et al.*: Validation of transgenic mice carrying the human prototype c-Ha-ras gene as a bioassay model for rapid carcinogenicity testing. *Environ Health Perspect.* 1998; 106(Suppl 1): S57-S69.
- 65) Yamamoto S, Hayashi Y, Mitsumori K, *et al.*: Rapid carcinogenicity testing system with transgenic mice harboring human prototype c-HRAS gene. *Lab Anim Sci.* 1997; 47: 121-6.
- 66) Yamamoto S, Mitsumori K, Kodama Y, *et al.*: Rapid induction of more malignant tumors by various genotoxic carcinogens in transgenic mice harboring a human prototype c-Ha-ras gene than in control non-transgenic mice. *Carcinogenesis.* 1996; 17: 2455-61.
- 67) Tsuda H, Futakuchi M, Fukamachi K, *et al.*: A medium-term, rapid rat bioassay model for the detection of carcinogenic potential of chemicals. *Toxicol Pathol.* 2010; 38: 182-7.
- 68) Ito N, Tamano S, Shirai T: A medium-term rat liver bioassay for rapid *in vivo* detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Sci.* 2003; 94: 3-8.
- 69) Shirai T, Hirose M, Ito N: Medium-term bioassays in rats for rapid detection of the carcinogenic potential of chemicals. *IARC Sci Publ.* 1999; (146): 251-72.
- 70) Ito N, Imaida K, Tamano S, *et al.*: Medium-term bioassays as alternative carcinogenicity test. *J Toxicol Sci.* 1998; 23(Suppl 2): S103-S106.
- 71) Tollefsen KE, Scholz S, Cronin *et al.*: Applying adverse outcome pathways (AOPs) to support integrated approaches to testing and assessment (IATA). *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014; 70: 629-40.
- 72) Fenner-Crisp PA, Mayes ME, David RM: Assessing the human carcinogenic potential of tetrahydrofuran: I. Mode of action and human relevance analysis of the male rat kidney tumor. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011; 60: 20-39.
- 73) Cruzan G, Borghoff SJ, de Peyster A, *et al.*: Methyl tertiary-butyl ether mode of action for cancer endpoints in rodents. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007; 47: 156-65.
- 74) Hall AP, Elcombe CR, Foster JR, *et al.*: Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse and non-adverse) changes-conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicol Pathol.* 2012; 40: 971-94.
- 75) Ross J, Plummer SM, Rode A, *et al.*: Human constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) support the hypertrophic but not the hyperplastic response to the murine nongenotoxic hepatocarcinogens phenobarbital and chlordane *in vivo*. *Toxicol Sci.* 2010; 116: 452-66.
- 76) Platel A, Nessler F, Gervais V, *et al.*: Study of oxidative DNA damage in TK6 human lymphoblastoid cells by use of the *in vitro* micronucleus test: Determination of No-Observed-Effect Levels. *Mutat Res.* 2009; 678: 30-7.
- 77) Fukushima S, Kinoshita A, Puatanachokchai R, *et al.*: Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis.* 2005; 26: 1835-45.
- 78) Fioravanzo E, Bassan A, Pavan M, *et al.*: Role of *in silico* genotoxicity tools in the regulatory assessment of pharmaceutical impurities. *SAR QSAR Environ Res.* 2012; 23: 257-77.
- 79) Blake BW, Enslein K, Gombar VK, *et al.*: Salmonella mutagenicity and rodent

- carcinogenicity: quantitative structure-activity relationships. *Mutat Res.* 1990; 241: 261-71.
- 80) Ashby J: Aspects of database construction and interrogation of relevance to the accurate prediction of rodent carcinogenicity and mutagenicity. *Environ Health Perspect.* 1991; 96: 97-100.
- 81) Klopman G, Rosenkranz HS: International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Approaches to SAR in carcinogenesis and mutagenesis. Prediction of carcinogenicity/mutagenicity using MULTICASE. *Mutat Res.* 1994; 305: 33-46.
- 82) Benigni R, Bossa C, Worth A: Structural analysis and predictive value of the rodent *in vivo* micronucleus assay results. *Mutagenesis.* 2010;25:335-41.
- 83) Sutter A, Amberg A, Boyer S, *et al.*: Use of *in silico* systems and expert knowledge for structure-based assessment of potentially mutagenic impurities. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2013; 67: 39-52.
- 84) Worth AP, Lapenna S, Serafimova R: QSAR and metabolic assessment tools in the assessment of genotoxicity. *Methods Mol Biol.* 2013; 930: 125-62.
- 85) Mekenyan OG, Petkov PI, Kotov SV, *et al.*: Investigating the relationship between *in vitro* *in vivo* genotoxicity: derivation of mechanistic QSAR models for *in vivo* liver genotoxicity and *in vivo* bone marrow micronucleus formation which encompass metabolism. *Chem Res Toxicol.* 2012; 25: 277-96.
- 86) Carrasquer CA, Malik N, States G, *et al.*: Chemical structure determines target organ carcinogenesis in rats. *SAR QSAR Environ Res.* 2012; 23: 775-95.
- 87) Sakai A, Sasaki K, Hayashi K, *et al.*: An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res.* 2011; 725: 57-77.
- 88) Sakai A, Sasaki K, Muramatsu D, *et al.*: A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res.* 2010; 702: 100-22.
- 89) Muramatsu D, Sasaki K, Kuroda S, *et al.*: Comparison of sensitivity to arsenic compounds between a Bhas 42 cell transformation assay and a BALB/c 3T3 cell transformation assay. *Mutat Res.* 2009; 675: 66-70.
- 90) Ohmori K, Umeda M, Tanaka N, *et al.*: An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells. *Altern Lab Anim.* 2005; 33: 619-39.
- 91) Asada S, Sasaki K, Tanaka N, *et al.*: Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells). *Mutat Res.* 2005; 588: 7-21.
- 92) Ohmori K, Sasaki K, Asada S, *et al.*: An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells. *Mutat Res.* 2004; 557: 191-202.
- 93) [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV\\_JM\\_MONO%282016%291.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV_JM_MONO%282016%291.pdf)
- 94) Mauthe RJ, Gibson DP, Bunch RT, *et al.*: The syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay: review of the methods and results. *Toxicol Pathol.* 2001; 29(Suppl 1): S138-S146.
- 95) <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/Guidance-Document-on-the-in-vitro-Syrian-Hamster-Embryo-Cell-Transformation-Assay.pdf>
- 96) Hendriks G, Derr RS, Misovic B, *et al.*: The extended ToxTracker assay discriminates between Induction of DNA damage, oxidative stress, and protein misfolding. *Toxicol Sci.* 2016; 150: 190-203.
- 97) Yamada F, Sumida K, Uehara T, *et al.*: Toxicogenomics discrimination of potential hepatocarcinogenicity of non-genotoxic compounds in rat liver. *J Appl Toxicol.* 2012; doi: 10.1002/jat.2790.
- 98) Matsumoto H, Yakabe Y, Saito F, *et al.*: New short term prediction method for chemical carcinogenicity by hepatic transcript profiling following 28-day toxicity tests in rats. *Cancer Inform.* 2011; 10: 259-71.
- 99) Uehara T, Minowa Y, Morikawa Y, *et al.*: Prediction model of potential hepatocarcinogenicity of rat hepatocarcinogens using a large-scale toxicogenomics database. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 255: 297-306.

- 100) Matsumoto H, Yakabe Y, Saito K, *et al.*: Discrimination of carcinogens by hepatic transcript profiling in rats following 28-day administration. *Cancer Inform.* 2009; 7: 253–69.
- 101) Uehara T, Hirode M, Ono A, *et al.*: A toxicogenomics approach for early assessment of potential non-genotoxic hepatocarcinogenicity of chemicals in rats. *Toxicology.* 2008; 250: 15–26.
- 102) Masumura K, Matsui M, Katoh M, *et al.*: Spectra of gpt mutations in ethylnitrosourea-treated and untreated transgenic mice. *Environ Mol Mutagen.* 1999; 34: 1–8.
- 103) Hayashi H, Kondo H, Masumura K, *et al.*: Novel transgenic rat for *in vivo* genotoxicity assays using 6-thioguanine and Spi<sup>-</sup> selection. *Environ Mol Mutagen.* 2003; 41: 253–9.
- 104) Umemura T, Kanki K, Kuroiwa Y, *et al.*: *In vivo* mutagenicity and initiation following oxidative DNA lesion in the kidneys of rats given potassium bromate. *Cancer Sci.* 2006; 97: 829–35.
- 105) Nohmi T, Suzuki T, Masumura K: Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays. *Mutat Res.* 2000; 455: 191–215.
- 106) Nishikawa A, Umemura T, Ishii Y, *et al.*: *In vivo* approaches to study mechanism of action of genotoxic carcinogens. *Genes Environ.* 2008; 30: 120–4.
- 107) Nishikawa A, Suzuki T, Masumura K, *et al.*: Reporter gene transgenic mice as a tool for analyzing the molecular mechanisms underlying experimental carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2001; 20: 111–5.
- 108) Jin M, Kijima A, Hibi D, *et al.*: *In vivo* genotoxicity of methyleugenol in *gpt* delta transgenic rats following medium-term exposure. *Toxicol Sci.* 2013; 131: 387–94.
- 109) Tasaki M, Kuroiwa Y, Inoue T, *et al.*: Oxidative DNA damage and *in vivo* mutagenicity caused by reactive oxygen species generated in the livers of *p53*-proficient or -deficient *gpt* delta mice treated with non-genotoxic hepatocarcinogens. *J Appl Toxicol.* 2012; doi: 10.1002/jat.2807.
- 110) Jin M, Kijima A, Suzuki Y, *et al.*: *In vivo* genotoxicity of 1-methylnaphthalene from comprehensive toxicity studies with B6C3F1 *gpt* delta mice. *J Toxicol Sci.* 2012; 37: 711–21.
- 111) Suzuki Y, Umemura T, Hibi D, *et al.*: Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Arch Toxicol.* 2012; 86: 1593–601.
- 112) Okamura T, Ishii Y, Suzuki Y, *et al.*: Effects of co-treatment of dextran sulfate sodium and MeIQx on genotoxicity and possible carcinogenicity in the colon of *p53*-deficient mice. *J Toxicol Sci.* 2010; 35: 731–41.
- 113) Okamura T, Ishii Y, Suzuki Y, *et al.*: Enhancing effects of carbon tetrachloride on *in vivo* mutagenicity in the liver of mice fed 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx). *J Toxicol Sci.* 2010; 35: 709–20.
- 114) Masumura K, Sakamoto Y, Ikeda M, *et al.*: Antigenotoxic effects of *p53* on spontaneous and ultraviolet light B—induced deletions in the epidermis of *gpt* delta transgenic mice. *Environ Mol Mutagen.* 2011; 52: 244–52.
- 115) Tasaki M, Umemura T, Suzuki Y, *et al.*: Oxidative DNA damage and reporter gene mutation in the livers of *gpt* delta rats given non-genotoxic hepatocarcinogens with cytochrome P450-inducible potency. *Cancer Sci.* 2010; 101: 2525–30.
- 116) Toyoda-Hokaiwado N, Inoue T, Masumura K, *et al.*: Integration of *in vivo* genotoxicity and short-term carcinogenicity assays using F344 *gpt* delta transgenic rats: *in vivo* mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers. *Toxicol Sci.* 2010; 114: 71–8.
- 117) Totsuka Y, Higuchi T, Imai T, *et al.*: Genotoxicity of nano/microparticles in *in vitro* micronuclei, *in vivo* comet and mutation assay systems. *Part Fibre Toxicol.* 2009; 6: 23.
- 118) Umemura T, Tasaki M, Kijima A, *et al.*: Possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and *in vivo* mutagenicity in kidneys of *gpt* delta rats treated with potassium bromate. *Toxicology.* 2009; 257: 46–52.
- 119) Umemura T, Kuroiwa Y, Tasaki M, *et al.*: Detection of oxidative DNA damage, cell proliferation and *in vivo* mutagenicity induced by dicyclanil, a non-genotoxic carcinogen, using *gpt* delta mice. *Mutat Res.* 2007; 633: 46–54.
- 120) Kuroiwa Y, Umemura T, Nishikawa A, *et al.*: Lack of *in vivo* mutagenicity and oxidative DNA damage by flumequine in the livers of *gpt* delta mice. *Arch Toxicol.* 2007; 81: 63–9.

- 121) Nishikawa A, Sai K, Okazaki K, *et al.*: MX, a by-product of water chlorination, lacks *in vivo* genotoxicity in *gpt* delta mice but inhibits gap junctional intercellular communication in rat WB cells. *Environ Mol Mutagen.* 2006; 47: 48-55.
- 122) Kanki K, Nishikawa A, Masumura K, *et al.*: *In vivo* mutational analysis of liver DNA in *gpt* delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens *N*-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline, and di (2-ethylhexyl)phthalate. *Mol Carcinog.* 2005; 42: 9-17.
- 123) Masumura K, Horiguchi M, Nishikawa A, *et al.*: Low dose genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in *gpt* delta transgenic mice. *Mutat Res.* 2003; 541: 91-102.
- 124) Cohen SM: Human carcinogenic risk evaluation: an alternative approach to the two-year rodent bioassay. *Toxicol Sci.* 2004; 80: 225-9.
- 125) Matsushita K, Ishii Y, Takasu S, *et al.*: A medium-term *gpt* delta rat model as an *in vivo* system for analysis of renal carcinogenesis and the underlying mode of action. *Exp Toxicol Pathol.* 2015; 67: 31-9.
- 126) Matsushita K, Kuroda K, Ishii Y, *et al.*: Improvement and validation of a medium-term *gpt* delta rat model for predicting chemical carcinogenicity and underlying mode of action. *Exp Toxicol Pathol.* 2014; 66: 313-21.