

遺伝毒性と発がん性を包括的に評価できる中期肝発がんリスク評価系の開発

研究分担者： 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

本研究では、DCP のマウスおよびハムスターにおける肝・胆道系および肝薬物代謝酵素発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。昨年度に行った DCP の B6C3F1 マウスおよびシリアンハムスターを用いた 3 日間強制胃内投与試験では、500 mg/kg BW の用量でマウスおよびハムスターに広範囲な小葉中心性肝細胞壊死を誘発することを明らかとした。また、マウスおよびハムスターの DCP 投与群で、非壊死領域の肝細胞における GST-T1 の発現が対照群に比較して増加したことから、GST-T1 が DCP の毒性発現機序に参与する可能性が示唆された。本年度では、さらなる肝毒性機序の解明を目指し、B6C3F1 マウスおよびシリアンハムスターに前年度より低い用量の DCP（125 ないし 250 mg/kg BW）で 4 週間強制胃内投与を行い、DCP の肝胆道系および肝薬物代謝酵素に及ぼす影響を検討した。その結果、マウスおよびハムスター共に、125 および 250 mg/kg BW 投与群の全例で肝細胞におけるびまん性脂肪変性が認められた。一方、マウスおよびハムスターの胆管上皮では、病理組織学的所見を認めず、Ki-67 陽性率で、対照群と DCP 投与群との間に有意な差を認めなかった。肝細胞の薬物代謝酵素に対する検討では、マウスおよびハムスター共に、小葉中心部（壊死発生部位）が CYP2E1 陽性であったことから、CYP2E1 が DCP 誘発肝細胞障害の発症に重要である可能性が示唆された。一方、GST-T1 の発現では、対照群に比較して DCP 投与群で壊死発生部位である小葉中心部で減少し、小葉周辺部では増強したことから、GST-T1 は、DCP の解毒酵素として働く可能性が強く示唆された。また、マウスとハムスターの DCP 投与群で CYP2A4 の発現増加が認められた。以上より、マウスおよびハムスターにおいては、DCP による肝細胞毒性が認められ、CYP2E1、CYP2A4 および GST-T1 による DCP の代謝が毒性発現機序に重要であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、大阪の印刷工場労働者において胆管がんが多発しており、既知の胆管がん発症機序であるウイルス感染、膵・胆管合流異常、結石や肝吸虫による発がん機序と異なる化学物質による発がん機序の可能性が示唆されている。現在、dichloromethane(DCM) 及び 1,2-dichloropropane(DCP) などを含む有機溶剤の長期間にわたる高濃度曝露が胆管がん発症の原因として疑われている。一方、ラットとマウスを用いたがん原性試験において DCM および DCP の胆管発がん性は認められていないが、胆道系発がん高感受性であるハムスターを用いた一般毒性と発がん性の検討はまだなされていない。また、DCM および DCP の代謝に P450 酵素群及び glutathione S transferase T 1 (GST-T1) の関与を示唆する報告があるが、代謝経路の詳細に関する報告はまだなされていない。本研究では、DCM および DCP のハムスターおよびマウスにおける肝・胆道系および肝薬物代謝酵素発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。昨年度では、B6C3F1 マウスおよびシリアンハムスターに DCP および DCM を 500 mg/kg BW の用量で 1 日 1 回、3 日間強制胃内投与

を行った。その結果、胆管において、両化合物でハムスターおよびマウス投与群に毒性変化を認めなかった。一方、肝臓において、マウスおよびハムスターの DCP 投与群のみ全例に広範囲な小葉中心性肝細胞壊死が認められた。このことから、DCP は DCM と比較し、強い肝毒性を有することが明らかとなった。しかし、いずれの群においても胆管上皮傷害は認められなかった。また、マウスおよびハムスターの DCP 投与群で、非壊死領域の肝細胞における GST-T1 の発現が対照群に比較して増加したことから、GST-T1 が DCP の毒性発現機序に参与することが示唆されたが、肝細胞壊死が広範囲のためその他の代謝酵素を含めた詳細検討は行えなかった。そこで、本年度は、DCP 誘発肝毒性の機序解明にフォーカスして、B6C3F1 マウスおよびシリアンハムスターに前年度より低い用量の DCP（125 ないし 250 mg/kg BW）で 4 週間強制胃内投与を行い、DCP の肝胆道系および肝薬物代謝酵素に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1. 動物実験

7 週齢雄性 B6C3F1 マウス 15 匹を日本チャール

ス・リバー株式会社より購入した。7週齢雄性シリアンハムスター15匹を日本エスエルシー株式会社より購入した。マウスとハムスターとも、1週間の馴化飼育の後、各群5匹ずつ3群に分けた。

被検物質投与群にそれぞれにDCP(和光純薬、1,2-dichloropropane dichloromethane、純度：>98%)を125ないし250 mg/kg BWの用量で、5回/週、4週間強制胃内投与を行った。溶媒対照群にはコーン油(和光純薬)を投与した。全動物は、一般状態を毎日観察し、週1回体重、飲水量および摂餌量を測定した。実験開始より4週間後に、全動物を麻酔下で、腹部大動脈から採血後に脱血致死させ、と殺・剖検を行い、肝臓を摘出し、重量を測定した。全群において肝臓のホルマリン固定パラフィン標本作製し、病理組織学的検討ならびにCYP2E1、Glutathione S-transferase T1(GST-T1)、Ki-67の免疫組織化学的検討を行った。また、マウスの肝臓凍結サンプルからRNAを抽出し、quantitative RT-PCRを用いて薬物代謝酵素であるシトクロームP450スーパーファミリー1-4各分子種のmRNA発現を検討した。その中で変動が認められたCYP1A1およびCYP2A4については、ハムスターおよびマウスの肝臓凍結サンプルからタンパク質を抽出し、Western blot法を用いてその発現量を検討した。

2. 統計学的解析

体重、摂餌量、臓器重量およびP450各分子種の発現量の平均値についてBarlett法による等分散検定を行った。等分散の場合はパラメトリックのDunnett法による両側検定を行い、不等分散の場合はノンパラメトリックのSteel法による両側検定を行った。病理組織学的検査における発生頻度の差の検定については、Fisherの直接確率検定を行った。

3. 倫理面への配慮

動物実験は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設において行われ、動物実験の開始前には実験計画書を大阪市立大学実験動物委員会に提出し、その承諾を得た上で動物実験取り扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないために麻酔下にて実施した。

C. 研究結果

1. 一般状態

最終体重、生存率、絶対および相対肝重量を表1に示す。

マウスのDCP投与群で死亡例は認められなかった。最終体重が各投与群の間に有意な差は認められなかったが、絶対および相対肝重量が対照群に比較して125および250 mg/kg BW投与群で有意に増加した。

ハムスターにおいて、125 mg/kg BW投与群で第1週に、250 mg/kg BW投与群で第1、3、および4週

に、1例ずつ死亡が認められた。最終体重が対照群に比較して250 mg/kg BW投与群で統計学的に有意な差は認められなかったものの、顕著に低下した。相対肝重量が250 mg/kg BW投与群で有意に増加したが、絶対肝重量には有意な変化は認められなかったため、相対肝重量の増加は体重の減少に伴ったものと考えられた。

2. 肝臓における病理学的所見

マウスとハムスターとともに、125および250 mg/kg BW投与群の全例にびまん性に脂肪変性が認められた。しかし、いずれの群においても胆管上皮にはDCP投与による変化は認められなかった(表2)。

3. マウス肝臓における薬物代謝酵素の発現

免疫組織化学染色の結果を表2に示す。小葉中心部の肝細胞にCYP2E1の発現が認められた。125および250 mg/kg BW投与群でCYP2E1の発現がDCP投与による変化は認められなかったが、昨年度の実験で得られた500 mg/kg BW DCPを投与したマウスの肝臓について検討したところ、肝細胞壊死がCYP2E1陽性領域内で起こっていることを見いだした(図1)。

GST-T1の発現が小葉中心部の肝細胞に認められ、その発現量が対照群に比較して125および250 mg/kg BW投与群で減少した(図2)。胆管上皮細胞においてもGST-T1の発現が認められたが、DCP投与による変化は認められなかった。

マウス肝におけるP450スーパーファミリー1-4各分子種のmRNA発現量を検討した結果(図3A) CYP2A4およびCYP4A14の発現量が125および250 mg/kg BW投与群で、CYP1A1が250 mg/kg BW投与群で有意に増加した。一方、CYP2C29およびCYP3A11が両DCP投与群で有意に減少した。なお、CYP1A2、CYP1B1、CYP2B10、CYP2E1およびCYP4A10が対照群とDCP投与群の間に有意な差は認められなかった。さらに、CYP1A1およびCYP2A4について、Western blot法を用いてタンパク質の発現量を検討した結果(図3B) CYP2A4の発現量が対照群に比較して125および250 mg/kg BW投与群で増加したことが確認された。一方、CYP1A1の発現量にはDCP投与による変化は認められなかった。CYP4A14の蛋白質発現解析に適した抗体が入手できなかったため、そのタンパク質発現量の検討は行わなかった。

4. ハムスター肝臓における薬物代謝酵素の発現

免疫組織化学染色では、小葉中心部の肝細胞にCYP2E1の発現が認められ、その発現が対照群に比較して125 mg/kg BW投与群で変化は認められなかったが、250 mg/kg BW投与群では明らかな増強が認められた(図4)。さらに、昨年度の実験で得られた500 mg/kg BW DCPを投与したハムスターの肝臓について検討したところ、マウスと同様に肝細胞壊死がCYP2E1陽性領域内に起こっていることを見だし

た(図5)。

GST-T1 が対照群の肝小葉全体に発現が認められ、小葉中心部で周辺部より高い発現を示した。GST-T1 の発現が 125 mg/kg BW 投与群で対照群に比較して小葉中心部で軽度に減少したが、小葉周辺部では軽度に増加した。さらに、250 mg/kg BW 投与群において、GST-T1 の発現が小葉中心部で認められなかったが、小葉周辺部では顕著に増加した(図6)。

一方、胆管上皮細胞ではいずれの群においても CYP2E1 および GST-T1 の発現は認められなかった。

さらに、マウスの肝臓で DCP 投与により mRNA 発現の増加が認められた CYP1A1 および CYP2A4 について、Western blot 法を用いて検討した結果(図7) CYP2A4 の発現量が対照群に比較して 125 および 250 mg/kg BW 投与群で増加した。一方、CYP1A1 の発現量には DCP 投与による変化は認められなかった。

5. マウスおよびハムスターの胆管上皮における細胞増殖能

マウスおよびハムスターの胆管上皮における Ki-67 陽性率は、各群の間に有意な差を認めなかった(図8)。

D. 考察

マウスとハムスターとともに、DCP 投与による肝細胞壊死が CYP2E1 陽性領域内に認められたことから、CYP2E1 が DCP の肝毒性の発現には重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、興味深いことに、GST-T1 により代謝された際の代謝中間体が DCP の発がんに関与する可能性が報告されているが、本研究では、GST-T1 の発現が対照群に比較してマウスおよびハムスターの DCP 投与群で小葉中心部(壊死の発生部位)の肝細胞で減少し、小葉周辺部(壊死の非発生部位)の肝細胞では増強した。これらのことから、GST-T1 が肝細胞においては DCP の解毒酵素として働いていることが強く示唆された。今後の予定として、CYP2E1 欠損マウスを用いて、CYP2E1 の DCP の肝毒性の発現における役割を明らかにすると同時に、DCP が CYP2E1 の欠損によって作り出された GST-T1 の高活性化状態下で肝胆道系に及ぼす影響を検討する。

また、本研究では DCP 投与群で胆管上皮に組織学的変化および細胞増殖能の変動は認められなかったが、投与期間が短いため、DCP の胆管系に及ぼす影響を明らかにするためには、今後長期投与試験ならびに二段階胆管発がんモデルを用いた検討が必要と考えられた。

E. 結論

本研究の条件下では、DCP がマウスおよびハムスターにおいて肝毒性を示すことが明らかとなった。一方で、胆管上皮における DCP の毒性は特定できなかった。また、CYP2E1, 2A4 および GST-T1

が DCP の代謝及びその肝毒性の発現に関与することが示唆された。本研究は DCP の胆管発がんリスク評価モデルの開発に有用な基礎データを提供できたものと考えられる。

F. 健康危険情報

1,2-ジクロロプロパンがマウスおよびハムスターでは肝毒性を示す。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. [Wei M](#), Yamada T, Yamano S, Kato M, Kakehashi A, Fujioka M, Tago Y, Kitano M, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 273, 390-400, 2013.
2. Xie XL, Kakehashi A, [Wei M](#), Yamano S, Takeshita M, Yunoki T, Wanibuchi H. l-Leucine and l-isoleucine enhance growth of BBN-induced urothelial tumors in the rat bladder by modulating expression of amino acid transporters and tumorigenesis-associated genes. *Food Chem Toxicol*, 59, 137-144, 2013.
3. Hanada S, Nishiyama N, Mizuguchi S, Yamano S, Kakehashi A, [Wei M](#), Inoue H, Komatsu H, Chung K, Suehiro S, Wanibuchi H. Clinicopathological significance of combined analysis of cytokeratin 19 expression and preoperative serum CYFRA21-1 levels in human lung squamous cell carcinoma. *Osaka City Med J*, 59, 35-44, 2013.
4. Komatsu H, Kakehashi A, Nishiyama N, Izumi N, Mizuguchi S, Yamano S, Inoue H, Hanada S, Chung K, [Wei M](#), Suehiro S, Wanibuchi H. Complexin-2 (CPLX2) as a potential prognostic biomarker in human lung high grade neuroendocrine tumors. *Cancer Biomark*,

13, 171-180, 2013.

5. Hanada S, Kakehashi A, Nishiyama N, Wei M, Yamano S, Chung K, Komatsu H, Inoue H, Suehiro S, Wanibuchi H. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate as a prognostic biomarker in human primary lung squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark*, 13, 289-298, 2013.
6. Kakehashi A, Hagiwara A, Imai N, Nagano K, Nishimaki F, Banton M, Wei M, Fukushima S, Wanibuchi H. Mode of action of ethyl tertiary-butyl ether hepatotumorigenicity in the rat: Evidence for a role of oxidative stress via activation of CAR, PXR and PPAR signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*, 273, 390-400, 2013.

2. 学会発表

1. 鰐淵英機、桑江優子、魏 民、若狭研一、梯アンナ：ヒト肝細胞癌における特異的候補分子の機能解析．第 102 回日本病理学会総会，札幌（2013 年 6 月）．
2. 梯アンナ、萩原昭裕、今井則夫、長野嘉介、西脇富久美、魏 民、福島昭治、鰐淵英機：ラットにおける 2-エトキシ-2-メチルプロパンの肝臓発腫瘍性機序の解明．第 28 回発癌病理研究会，沖縄（2013 年 8 月）
3. 魏 民、山野莊太郎、藤岡正喜、加藤 実、武下正憲、梯アンナ、鰐淵英機：1,2-ジクロロプロパンのマウスおよびハムスターの肝臓における代謝および毒性発現機序の検討．第 72 回日本癌学会学術総会，横浜（2013 年 10 月）
4. 魏 民、山野莊太郎、藤岡正喜、梯アンナ、下村衣里、神吉将之、鰐淵英機：シリアンハムスターにおける 1,2 dichloropropan の強制経口投与による肝毒性とその発現機序の検討．第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島，(2014 年 1 月)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

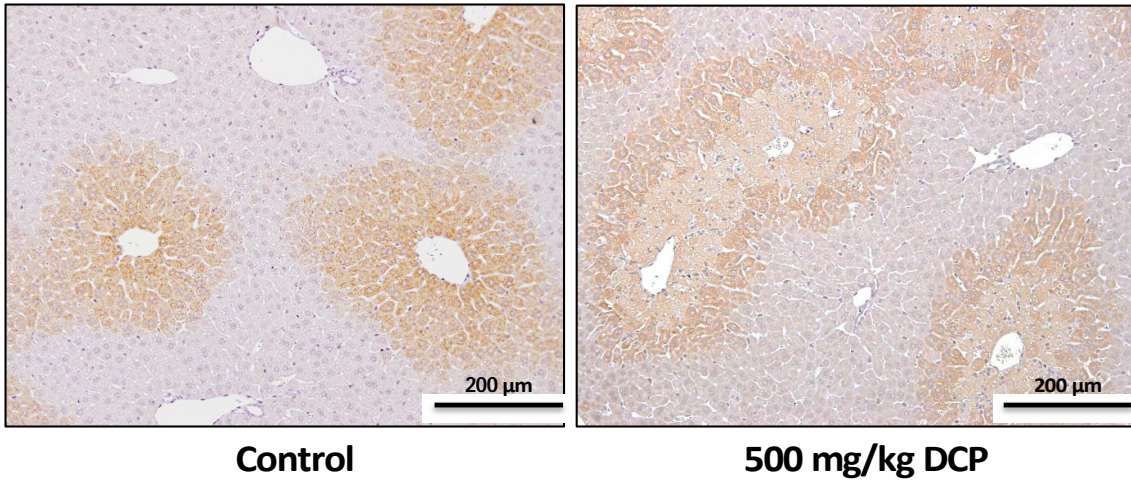


図1 . マウス肝臓における CYP2E1 の発現(3 日間試験)

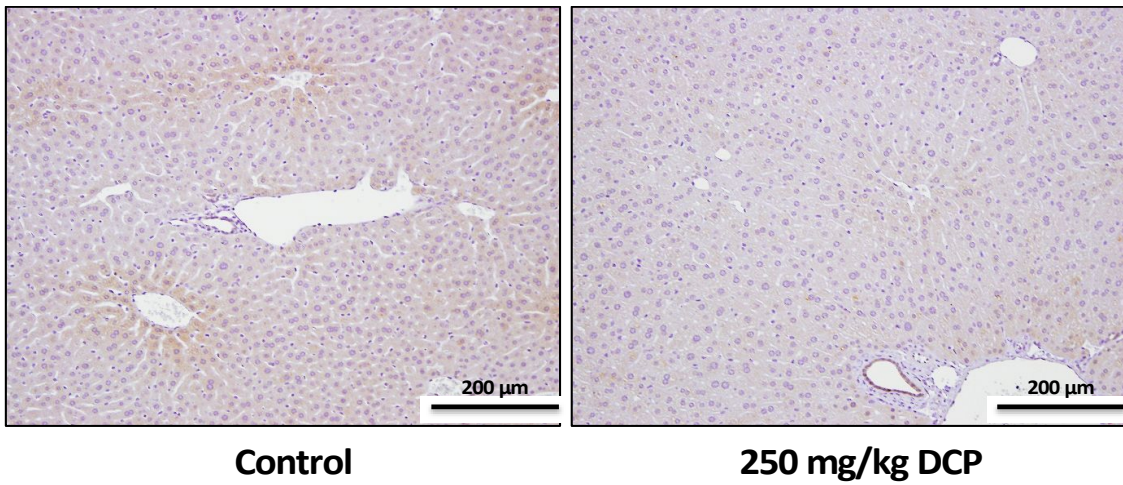


図2 . マウス肝臓における GST-T1 の発現(4 週間試験)

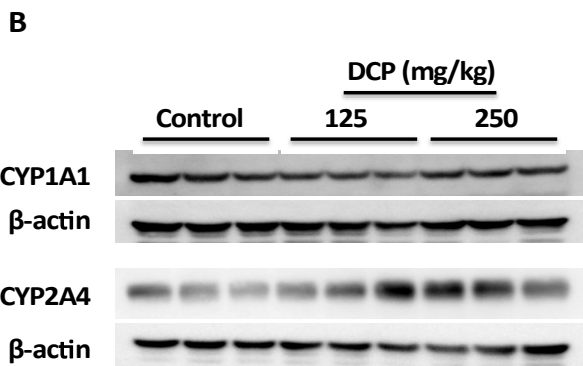
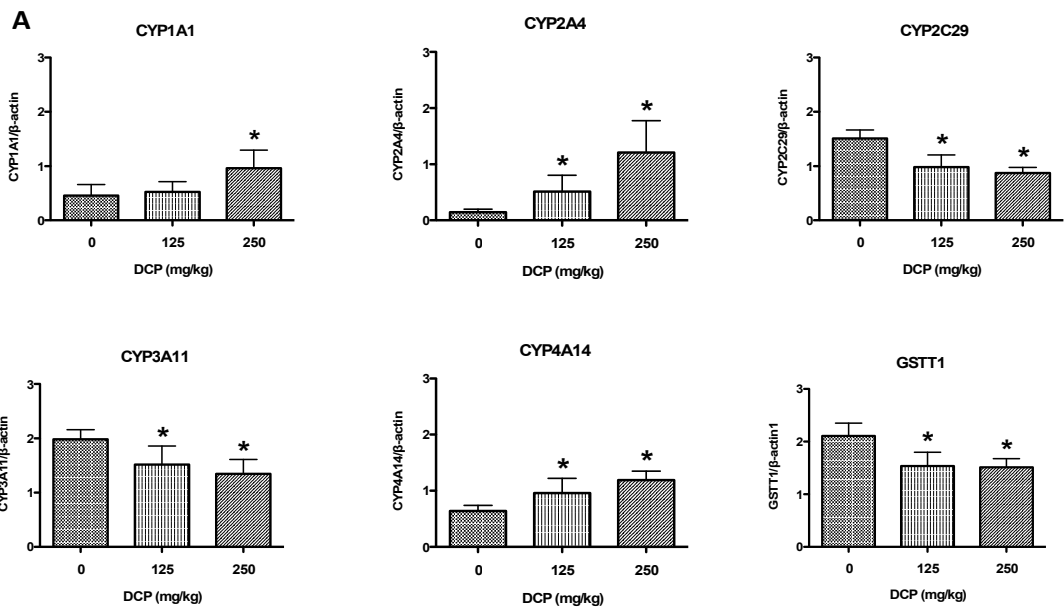


図3 . マウス肝臓における P450 分子種の発現. A:mRNA 発現量 (Q-PCR 法) ; B:蛋白質発現量 (Western blot 法)