

201426012A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の
短期包括的試験法の開発に関する研究

(H24-食品-一般-012)

平成 26 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成 27(2015)年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

| | |
|---|---|
| 食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の 開発に関する研究 ----- | 1 |
| 西川 秋佳 | |

II. 分担研究報告

| | |
|---|----|
| 1. 肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発 西川 秋佳 ----- | 10 |
| 2. 腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発 梅村隆志 ----- | 21 |
| 3. 2-メチルフランの一般毒性・遺伝毒性・発がん性の 包括的評価 ----- | 30 |
| 小川久美子 | |

| | |
|---------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 46 |
|---------------------------|----|

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

平成 26 年度 総括研究報告書

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究

研究代表者：西川 秋佳 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

研究要旨

本年度は、*gpt delta* ラットを用いた肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発を目的とし、昨年度までの研究により樹立した改良プロトコールによる新試験法の有用性を検証するため、既知の遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質および非遺伝毒性肝発がん物質を用いて検討した。その結果、いずれの被験物質についても妥当な結果が得られた。以上より、肝臓における短期包括的試験法を確立した。また、*gpt delta* ラットを用いた腎臓を標的とする化学物質の遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発を目的とし、昨年度までの研究により樹立した標準プロトコールの有用性を検証する目的で、既知の遺伝毒性腎発がん物質、非遺伝毒性腎発がん物質および雄ラット特有腎発がん物質を用いて検討した。その結果、標準プロトコールの有用性を支持する結果が得られた。以上より、腎臓における短期包括的試験法を確立した。さらに、フラン骨格を有する化合物のラット肝臓における詳細な遺伝毒性評価を目的として、基本骨格であるフランの肝臓におけるレポーター遺伝子突然変異試験、肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験、肝臓の病理組織学的検索ならびに前がん病変（GST-P 陽性細胞巣）の定量解析を実施した。その結果、肝臓への毒性影響（肝細胞のアポトーシス、胆管線維症）が認められたが、レポーター遺伝子突然変異試験および肝細胞小核試験のいずれも陰性であった。

キーワード： 遺伝毒性、発がん性、短期包括的試験法、*gpt delta* ラット、フラン

| | |
|-----------------------------------|---|
| 研究分担者及び研究協力者の氏名・所属機関名及び所属機関における職名 | 研究協力者 高須 信二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部主任研究官 |
|-----------------------------------|---|

研究分担者

| | |
|-------|-----------------------|
| 梅村 隆志 | 国立医薬品食品衛生研究所 病理部室長 |
| 小川久美子 | 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長 |

A. 研究目的
ラット発がん性試験は長期間を要する。
そのため、評価の迅速化を図る目的で開発されたラット肝短期発がん性試験法は予測

精度が高いが、検出するのは発がん性自体ではなく主に発がん促進作用である。一方、種々の遺伝毒性試験の中では *in vivo* 小核試験の成績が重視されるが、検索細胞・組織は赤血球及び骨髄に限定されるため、発がん標的臓器における遺伝毒性をどの程度正確に反映しているか不明な点も多い。近年開発されたレポーター遺伝子導入動物による遺伝毒性検索モデルは、臓器・組織レベルでの遺伝毒性の検索を可能にし、中でも *gpt delta* は点突然変異及び欠失変異を効率よく検出できることを利点とする。本研究は *gpt delta* ラットを用いた中期発がん性試験法を開発し、肝臓ないしは腎臓を主たる標的とする発がん性・遺伝毒性物質の検出モデルの開発を目的とする。これまでに、イニシエーター物質と被験物質の相互作用の回避を目的とした肝短期発がん試験法の改良プロトコルを樹立し、既知発がん物質を用いてその妥当性を検証した。また、非遺伝毒性腎発がん物質を用いて腎短期発がん性試験法の妥当性を検証した。本試験法では発がん性・遺伝毒性を迅速に検出できるため、この点が他の研究とは異なり独創的である。遺伝毒性の検索に部分的肝切除や片側腎摘出によって採取した臓器を活用することが本研究の特色の一つである。また、香料物質 2-メチルフラン (2-MF) および基本骨格フランについて、*gpt delta* ラットを用いた短期包括試験法により、その一般毒性、遺伝毒性ならびに発がん性を検討した。これまでに、2-MF の標的臓器である肝臓の *in vivo* 変異原性は陰性であるものの、前癌病変 (GST-P 陽性細胞巢) が増加することを報告し、2-MF は肝発がん性を有する可能

性を明らかにした。本年度は、*gpt delta* ラット肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験とレポーター遺伝子突然変異試験を組み合わせ、フラン骨格化合物の標的臓器における遺伝毒性をより詳細に検討した。

B. 研究方法

肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

6 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラット (日本 SLC) に遺伝毒性肝発がん物質として estragole (ES)、遺伝毒性非肝発がん物質として aristolochic acid (AA) をそれぞれ 150 mg/kg 体重および 0.3 mg/kg 体重の用量で週 7 日、強制経口投与し、非遺伝毒性肝発がん物質として β -naphthoflavone (BNF) および barbitol (BT) をそれぞれ 5000 および 2500 ppm の濃度で混餌投与した。それぞれの被験物質を 4 週間投与し、2 週間の休薬後に diethylnitrosamine (DEN) を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した。DEN 投与時に残存肝組織の細胞増殖活性が最大となるように、DEN 投与の 18 時間前に部分肝切除を施し、それにより得られた切除肝よりゲノム DNA を抽出して、*gpt assay* を実施した。DEN 投与 1 週間後に被験物質の投与を再開し、試験開始 13 週間後に動物を屠殺・解剖した。解剖時、残存肝組織の一部を 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬固定し、残りの組織を遺伝子解析用に液体窒素で急速凍結し保存した。ホルマリン固定した残存肝組織を用いて常法に従いパラフィン標本を作製し、全例について抗 GST-P 抗体を用いた免疫組織化学染色を施して GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。また ES 群

および AA 群については、残存肝における肝細胞の細胞増殖活性を評価する目的で、パラフィン標本において抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織化学染色を実施して PCNA 陽性細胞率を算出し、さらに凍結サンプルより total RNA を抽出し、リアルタイム PCR により細胞周期関連遺伝子である *Cyclin A2*, *Cyclin B1*, *Cyclin E1* および *E2f1* の mRNA 発現量を測定した。リアルタイム PCR の内在性コントロールには、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* を用いた。

腎臓における遺伝毒性・発がん性の短 2 期包括的試験法の開発

6 週齢の雌性 F344 系 *gpt delta* ラット (日本 SLC) に遺伝毒性腎発がん物質として *aristolochic acid (AA)*、雄ラット特有腎発がん物質として *d-limonene (DL)* をそれぞれ 0.3 mg/kg 体重および 600 mg/kg 体重の用量で週 7 回、強制経口投与し、非遺伝毒性腎発がん物質として *potassium dibasic phosphate (PDP)* および *phenylbutazone (PBZ)* をそれぞれ 50000 ppm および 2400 ppm の濃度で混餌投与した。それぞれの被験物質を 4 週間投与した後、投薬を中断して試験開始 6 週間後に DEN を 40 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した。DEN 投与時に残存腎組織の細胞増殖活性が最大となるように、DEN 投与の 48 時間前に片側腎摘出を実施し、それにより得られた摘出腎よりゲノム DNA を抽出して、*gpt assay* を実施した。DEN 投与 1 週間後に被験物質の投与を再開し、試験開始 19 週間後に動物を屠殺・解剖して、残存腎を採取した。残存腎のサンプル

を用いて常法に従いパラフィン標本を作製し、病理組織学的解析を実施した。病理組織学的解析においては、*atypical tubule (AT)* および *atypical hyperplasia (AH)* を尿細管前腫瘍性病変とし (Fig. 1)、その発生頻度および 1 個体あたりの発生個数を算出した。

2-メチルフランの一般毒性・遺伝毒性・発がん性の包括的評価

2-MF (ロット番号: CDL2169)、フラン (ロット番号: WEP0576) は和光純薬工業株式会社より購入した。2-MF はオリブオイルに、フランはコーンオイルに溶解した。N-Nitrosodiethylamine (DEN、ロット番号: D0516) は東京化成工業株式会社より購入した。DEN は精製水に溶解した。投与液は週 1 回調製し、使用直前まで冷蔵保存した。6 週齢の雄 SD 系 *gpt delta* ラット (日本エスエルシー) の各群 5 匹にフランを 2、4、8 mg/5mL/kg の用量で 4 週間 (7 日/週) 強制経口投与した。対照群には、媒体であるコーンオイルのみを投与し、陽性対照群には、DEN を 12.5 mg/5 mL/kg の用量で投与した。投与期間中、飼料は CRF-1 固形飼料を自由に摂取させた。解剖時にイソフルラン麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、肝臓を採取して肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験、レポーター遺伝子変異原性試験 (*gpt* 及び *Spi* アッセイ)、病理組織学的検索ならびに GST-P 陽性細胞巢の定量解析に供した。肝臓は外側左葉を剃刀で薄切し、氷冷した Hank' balanced salt solution (HBSS) に採取した。さらに 100 U/mL コラゲナーゼ (ヤクルト薬品工業株式会社) 含有 HBSS にて

37°C、50 rpm で1時間振とうしながらインキュベーションした後、ピペッティングにより細胞を単離した。細胞浮遊液は70µmのセルロースアセテート膜フィルターでろ過した後、10%緩衝ホルマリンと混和し固定した。肝細胞の染色はアクリジンオレンジ (AO) 及び DAPI 混液により実施した。観察に際しては、UV 励起の蛍光顕微鏡下で1個体あたり肝細胞2000個以上をカウントし、そのうち小核を有する肝細胞の割合を算出した。統計解析法は Kaetenbaum と Bowman の統計解析表を用い、有意水準は $p < 0.05$ とした。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して動物実験計画書を作成し、同動物実験委員会による承認を得た後に実施した。また、遺伝子組み換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組換え実験計画書を作成し、承認を得た後に使用した。

C. 研究結果

肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

ES 群および AA 群において対照群と比較して *gpt* 変異体頻度 (MF) の有意な上昇がみられた。変異スペクトラム解析では、対照群と比較して ES 群において A:T:C:G transversion および A:T-G:C transition 変異頻度の有意な上昇がみられ、AA 群においては A:T-T:A transversion の有意な上昇が認められた。ES 群における GST-P 陽

性細胞巢の数および面積、BNF 群および BT 群における GST-P 陽性細胞巢の数が対照群と比して有意な高値を示した。また、BNF 群および BT 群における GST-P 陽性細胞巢の面積は、有意差は認められなかったものの、対照群と比較して明らかな増加を示した。PCNA 免疫染色の結果、ES 群では対照群と比して PCNA 陽性細胞率の有意な増加が認められた一方で、AA 群においては対照群と比較して差はみられなかった。リアルタイム PCR の結果、検索したいずれの遺伝子においても、ES 群において対照群と比して有意な mRNA 発現量の増加を認めた一方で、AA 群においては対照群と比較して差はみられなかった。

腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

切除腎における *gpt* assay の結果、AA 群において対照群と比較して *gpt* 変異体頻度 (MF) の有意な上昇がみられた。変異スペクトラム解析においては、AA 群において対照群と比較して A:T-T:A transversion 変異頻度の有意な上昇がみられた。病理組織学的解析により算出した前腫瘍性病変について、AA 群および PDP 群における発生頻度および1個体あたりの発生個数、PBZ 群における1個体あたりの発生個数が対照群に比して有意な高値を示した。PDP 群および DL 群の残存腎組織の代表的な組織像については、近位尿細管上皮における石灰沈着が PDP 群においてみられた。DL 群では近位尿細管において α_{2u} -globulin の蓄積を示唆する好酸性硝子滴の沈着は認められなかった。

2-メチルフランの一般毒性・遺伝毒性・発がん性の包括的評価

4週間反復投与試験において、試験期間中の動物の一般状態に変化は認められず、死亡例も認められなかった。8 mg/kg で最終体重の低値、4 mg/kg 以上で肝臓相対重量の高値が認められた。肝臓の病理組織学的検査の結果、4 mg/kg 以上で肝細胞のアポトーシス、被膜化の細胞浸潤、卵円形細胞の増殖が認められ、8 mg/kg では胆管線維症が認められた。肝臓における GST-P 陽性細胞巢の定量解析の結果、いずれの用量においても、GST-P 陽性細胞巢の数および面積にフラン投与に起因した変動は認められなかった。肝臓におけるレポーター遺伝子変異原性試験の結果、いずれの用量においても、*gpt* および Spi アッセイにおいて、フラン投与に起因した変動は認められなかった。なお、陽性対照群ではいずれのアッセイにおいても有意な変異頻度の増加が認められた。肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験の結果、いずれの用量においても、小核を有する肝細胞率に変化は認められなかった。なお、陽性対照群では小核を有する肝細胞率の有意な増加が認められた。

D. 考察

肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

本研究は、*gpt delta* ラットを用いた肝臓における遺伝毒性・発がん性の中期的試験法の開発を目的とし、既知の遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質及び非遺伝毒性肝発がん物質を用いて、昨年度までの研究により樹立した改良プロトコ

ールを用いた新規試験法の有用性について検証した。その結果、切除肝における *gpt* assay では ES 群および AA 群において *gpt* MF の有意な上昇がみられ、残存肝における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析では ES 群、BNF 群および BT 群において GST-P 陽性細胞巢の有意な増加を認めた。これらの結果は、それぞれの発がん物質の Mode of Action を反映しているものと考えられた。また、AA は非発がん標的臓器である肝臓において *in vivo* 変異原性を示したことに着目し、切除肝において同様に *in vivo* 変異原性を示した肝発がん性を有する ES 群の結果と比較した。変異スペクトラム解析において、ES 群では A:T-C:G transversion および A:T-G:C transition 変異頻度の有意な上昇がみられ、これらの結果は ES 投与によってラット肝臓に形成される DNA 付加体の内、deoxyadenosine 付加体が遺伝子突然変異に寄与している可能性を示していると考えられた。一方、AA 投与によりラット肝臓において形成される AA 特異的 DNA 付加体は、主に deoxyadenosine 付加体であることが知られており、本研究においても AA 群では A:T-T:A transversion 変異頻度の有意な上昇がみられた。また、AA は発がん標的臓器である腎臓においても、AA 特異的 deoxyadenosine 付加体を形成し、同様の遺伝子突然変異を誘発するという報告がある。従って、ES あるいは AA を投与されたラットの肝臓と AA を投与されたラットの腎臓における遺伝毒性発現機序に大きな差異はないものと考えられた。そこで、過去に実施された網羅的遺伝子発現解析の結果から、AA を投与されたラットにおい

て、腎臓で発現上昇のみられた細胞周期関連遺伝子の数が肝臓と比較して多かったという事実を踏まえ、細胞周期関連因子をより詳細に両群間で比較した。ES 群および AA 群の残存肝において *Cyclin A2*, *Cyclin B1*, *Cyclin E1* およびその転写因子である *E2f1* の mRNA 発現量を測定した結果、何れの遺伝子においても、ES 群では有意な上昇を示したが、AA 群では変化がみられなかった。また、肝細胞の PCNA 陽性細胞率も ES 群においてのみ有意な上昇を示した。以上より、肝臓において AA は ES と同様に変異原性を示すものの、細胞増殖活性を亢進させないことが明らかとなった。遺伝子突然変異の生じた細胞が腫瘍細胞に形質転換するためには、細胞分裂による変異の固定が必須であると考えられている。本実験でも示された通り、AA 単独投与により肝臓における GST-P 陽性細胞巢の増加は観察されないことが知られているが、AA を投与後、肝プロモーター物質を処置することにより、GST-P 陽性細胞巢の形成が促進されたという報告もある。以上より、AA が肝臓において細胞増殖亢進作用を有していないことが AA の肝臓における非発がん性の一因である可能性が示された。本試験法においては化学物質の *in vivo* 変異原性およびプロモーション活性の評価に加え、切除肝組織あるいは残存肝組織を用いて発がんに関連する種々のパラメータを追加検索することにより、より詳細な発がん機序の解析も可能となることが考えられた。さらに本試験法においては、遺伝毒性は示すものの発がん性は示さない、いわゆる潜在性発がん物質の検出にも有用であることが示された。

腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

本年度は、腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発のため、種々の既知発がん物質を用いて、昨年度までの研究により樹立した標準プロトコールを用いた新規試験法の有用性を検証した。遺伝毒性腎発がん物質である AA は、ラット腎臓において deoxyadenosine 付加体を主とする AA 特異的 DNA 付加体を形成するという報告がある。摘出腎における *gpt* assay の結果、AA 群において *gpt* MF の有意な上昇がみられ、変異スペクトラム解析においては A:T-T:A transversion 変異頻度の有意な上昇がみられた。これらの結果は、AA 特異的 deoxyadenosine 付加体が遺伝子突然変異に寄与している可能性を示していると考えられた。*gpt delta* ラットは化学物質の *in vivo* 変異原性の評価のみでなく、塩基修飾と遺伝子変異との関連性を検索することについても有用であることがこれまでに示されている。従って、本試験法においても摘出腎や残存腎を用いて化学物質特異的 DNA 付加体の形成を測定することによって、遺伝毒性機序をより詳細に検索することも可能であると考えられた。また、残存腎における病理組織学的解析では、AA 群において前腫瘍性病変の有意な増加が認められ、この結果は AA の腎プロモーション作用を反映しているものと考えられた。PDP および PBZ はともに非遺伝毒性メカニズムによりラット腎臓において発がん性を示すことが知られている。本研究では、PDP 群および PBZ 群において *gpt* MF の上昇は認められなかったもの

の、尿細管前腫瘍性病変が有意に増加していたことから、本試験法は非遺伝毒性腎発がんプロモーター物質の検出にも有用であることが示された。また、PDP 投与群においては近位尿細管における石灰沈着が認められた。PDP は石灰沈着による尿細管の障害および再生を誘発し、細胞増殖亢進作用を発揮することが知られている。よって本試験法においては、前腫瘍性病変の解析に加えてさらに詳細な病理解析を実施することで、発がん機序に関するさらなる情報を得ることも可能となることが示された。DL は近位尿細管における α_{2u} -globulin の蓄積を介し、雄ラット特異的に腎発がん性を示すことが知られている。本研究においては、DL 群では *gpt* MF の上昇はみられず、前腫瘍性病変の増加も認められなかった。また残存腎においては、近位尿細管上皮において α_{2u} -globulin の沈着を示唆する好酸性硝子滴の沈着は認められなかった。 α_{2u} -globulin 腎症を介した発がん機序はヒトへの外挿性はないため、雌ラットを用いる本試験法ではこの偽陽性結果を回避できることが示された。以上の結果は、標準プロトコールを用いた本試験法の有用性を支持するものと考えられた。また、本試験法においては化学物質の腎臓における *in vivo* 変異原性および発がんプロモーション活性の評価に加え、発がんに関連する種々のパラメータを追加検索することにより、より詳細な発がん機序の解析も可能となることが示された。

2-メチルフランの一般毒性・遺伝毒性・発がん性の包括的評価

2-MF は、その基本骨格であるフランと

同様に、生体内で五員環が開裂することで活性化代謝物アセチルクロレインとなり、生体内高分子と共有結合することで毒性を発揮する可能性が報告されている。我々がこれまでに実施した *gpt delta* ラットを用いたフランの短期包括的毒性試験結果においても、2 mg/kg 以上の用量で肝重量増加ならびに胆道系パラメータの変動、胆管増生および胆管線維症が認められた。さらに、フランの 8 mg/kg 投与により、肝臓の GST-P 陽性細胞巢の数および面積の増加が認められた。従って、今回認められた 2-MF の肝毒性および肝発がん性（肝細胞がんおよび胆管がん）を示唆する変化は、フラン骨格に起因している可能性が考えられた。また、フランと同様に 2-MF についても、肝臓を用いた *in vivo* 変異原性試験ではレポーター遺伝子突然変異頻度に変化は認められなかったことから、フラン骨格化合物の肝発がん過程における遺伝毒性メカニズムの関与は明らかにならなかった。フランの *gpt delta* ラットにおける肝臓を用いたレポーター遺伝子変異原性試験および肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験の投与期間は、OECD ガイドラインあるいは文献にて報告されている 4 週間とした。フランを 4 週間反復投与した結果、8 mg/kg で最終体重の低値、4 mg/kg 以上で肝重量の増加が認められた。肝臓における GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に変化は認められなかったものの、肝臓の病理組織学的検索において肝細胞への影響（肝細胞のアポトーシス）および胆管系への影響（胆管線維症）、被膜下の細胞浸潤が認められたことから、4 週間投与においてもフラン骨格に起因した肝臓への影響は発揮されている

と考えられた。肝臓の *in vivo* 変異原性試験の結果、*gpt* 及び *Spi* アッセイにおけるいずれのレポーター遺伝子についても変異頻度に変化は認められなかった。さらに、肝細胞を用いた小核試験においても、フラン投与に起因した変化は認められなかった。従って、フラン骨格化合物の肝発がん過程において、主として遺伝毒性メカニズムが関与している可能性は低いと考えられた。なお、フランはラットにおいて、肝細胞がんに加えて胆管がんを誘発することが特徴的である。今回検討した肝臓におけるレポーター遺伝子変異原性試験および肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験は、いずれも肝細胞の遺伝毒性の有無を反映した結果と考えられることから、胆管がんの発生過程における遺伝毒性メカニズムの関与の詳細については明らかとならなかった。

E. 結論

肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法として、*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性および発がん性を同時に検出可能な新規肝短期発がん性試験法の開発を目指し、種々の既知発がん物質を改良プロトコールを用いた新規試験法に適用して検証した結果、その有用性が証明された。さらに、本試験法においては *in vivo* 変異原性およびプロモーション活性の評価に加え、発がんに関連する種々のパラメータを追加検索することにより、より詳細な発がん機序の考察が可能となることが考えられた。また、本試験法は潜在性発がん物質の検出にも有用であることが示された。

腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法として、*gpt delta* ラットを用

いた *in vivo* 変異原性および発がん性を同時に検出可能な新規試験法の開発を目指し、種々の既知発がん物質を標準プロトコールによる新試験法に適用して検証した結果、その有用性が証明された。さらに、本試験法においては *in vivo* 変異原性および発がんプロモーション活性の評価に加え、発がんに関連する種々のパラメータを追加検索することにより、より詳細な発がん機序の考察が可能となることが考えられた。また α_2 -globulin 腎症を介した発がん機序はヒトへの外挿性はないため、雌ラットを用いる本試験法ではこの偽陽性結果を回避できることも示された。

2-MF は、基本骨格であるフランと同様に肝毒性を示し、肝発がん性を示唆する変化が認められたが、肝臓のレポーター遺伝子変異原性試験は陰性であった。また、フランの肝臓におけるレポーター遺伝子変異原性は陰性であり、また肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験も陰性であった。従って、フラン骨格化合物によるラット肝発がん過程において、遺伝毒性メカニズムが関与している可能性は低いと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 学会発表

1. 松下幸平、木島綾希、石井雄二、高須伸二、金美蘭、黒田颯、増井則夫、能美健彦、小川久美子、西川秋佳、梅村隆志：レポーター遺伝子導入ラットを用いた短期発がん物質検出モデルの開発。日本毒性学会第 39 回大会（仙台, 2012. 07）

2. Kohei Matsushita, Yuji Ishii, Shinji Takasu, Ken Kuroda, Aki Kijima, Takehiko Nohmi, Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa, Takashi Umemura: A medium-term animal model using *gpt* delta rats for predicting chemical carcinogenicity and related mechanisms of action. SOT 2013 (San Antonio, 2013. 03)

3. 松下幸平、石井雄二、高須伸二、黒田顕、木島綾希、能美健彦、小川久美子、梅村隆志：レポーター遺伝子導入ラットを用いた短期腎発がん物質検出モデルの開発。日本毒性学会第40回大会（幕張，2013. 06）

G-2. 発表論文

1. Kohei Matsushita, Ken Kuroda, Yuji Ishii, Shinji Takasu, Aki Kijima, Hiroaki Kawaguchi, Noriaki Miyoshi, Takehiko Nohmi, Kumiko Ogawa, Akiyoshi

Nishikawa, Takashi Umemura: 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: 313-321.

2. Kohei Matsushita, Yuji Ishii, Shinji Takasu, Ken Kuroda, Aki Kijima, Takuma Tsuchiya, Hiroaki Kawaguchi, Noriaki Miyoshi, Takehiko Nohmi, Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa, Takashi Umemura: 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; 31-39.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

平成 26 年度 分担研究報告書

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究

分担研究課題：肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

研究分担者：西川 秋佳 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

研究要旨

本研究の目的は、*gpt delta* ラットに部分肝切除を施し、切除肝において *in vivo* 変異原性試験を実施し、残存肝において前がん病変である glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性肝細胞巢の定量的解析を実施することで、肝臓における遺伝毒性および発がん性を同時に検出することのできる新しい肝短期発がん性試験法を開発することである。本年度は遺伝毒性肝発がん物質として estragole (ES)、遺伝毒性非肝発がん物質として aristolochic acid (AA)、非遺伝毒性肝発がん物質として β -naphthoflavone (BNF) および barbital (BT) を用い、昨年度までの研究により樹立した改良プロトコールを用いた新規試験法の有用性について検証した。その結果、切除肝における *gpt* assay では、ES 群および AA 群において *gpt* 変異体頻度 (MF) の有意な上昇がみられ、残存肝における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析では、ES 群、BNF 群および BT 群において GST-P 陽性細胞巢の有意な増加がみられた。これらの結果はそれぞれの発がん物質の Mode of Action を反映しているものと考えられた。また、ES 群および AA 群における残存肝の細胞増殖活性を検索した結果、ES 群でのみ細胞増殖活性の亢進がみられた。AA が肝臓に対して発がん性を示さない原因にこの細胞増殖誘発能の欠如が含まれる可能性が考えられた。以上より、本試験法は化学物質の肝臓における *in vivo* 変異原性および発がんプロモーション活性の評価に加え、切除肝組織あるいは残存肝組織を用いて発がんに関連する種々のパラメータを同時に検索することで、より詳細な発がん機序の考察も可能となることが示された。また本試験法は、肝臓において遺伝毒性は示すものの発がん性は示さない、いわゆる潜在性肝発がん物質の検出にも有用である可能性が示された。

A. 研究目的

食品中に意図的に添加される食品添加物や非意図的に混在する汚染物質のヒトに対する安全性確保は、各種遺伝毒性試験やげっ歯類を用いた発がん性試験結果から担保している。しかし、ラットを主とする発がん

性試験には、長期の投与期間が必要であり、剖検や病理組織検査等を含めると、最終評価までに最短でも 3~4 年を要する。そこでこれまで、発がん性評価の迅速化を図る目的で、いくつかの短・中期検索法が開発されており、中でもラット肝中期発がん

性試験法は発がん性の予測精度が高いことが知られている。しかし、その原理はイニシエーション物質の投与により生じた前がん病変の促進作用を検出するものであり、その発がん過程への遺伝毒性の関与についての情報は得られない。

一方、従来の遺伝毒性試験と比べて、近年開発されたレポーター遺伝子導入動物による遺伝毒性検索モデルは、化学物質の体内動態を考慮に入れた、標的臓器での遺伝毒性を検索できる点から注目されている。特に、*gpt delta* ラットはレポーター遺伝子 *gpt* の点突然変異に加えて、遺伝子導入ベクター上の遺伝子 *red/gam* の欠失変異を検出できることを利点としている。

本研究では、*gpt delta* ラットに部分肝切除を施し、切除肝において *in vivo* 変異原性試験を実施し、残存肝において前がん病変である *glutathione S-transferase placental form* (GST-P) 陽性肝細胞巢の定量的解析を実施することで、肝臓における *in vivo* 変異原性および発がん性を同時に検出することのできる新しい肝短期発がん性試験法を開発することを目的とする。本年度は、昨年度までの研究により樹立した改良プロトコールを用いた新規試験法の有用性を遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質および非遺伝毒性肝発がん物質を用いて検証した。

B. 研究方法

6週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラット（日本 SLC）に遺伝毒性肝発がん物質として estragole (ES)、遺伝毒性非肝発がん物質として aristolochic acid (AA) をそれぞれ 150 mg/kg 体重および 0.3 mg/kg 体重の用量で週

7 日、強制経口投与し、非遺伝毒性肝発がん物質として β -naphthoflavone (BNF) および barbitol (BT) をそれぞれ 5000 および 2500 ppm の濃度で混餌投与した。それぞれの被験物質を 4 週間投与し、2 週間の休薬後に diethylnitrosamine (DEN) を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した。DEN 投与時に残存肝組織の細胞増殖活性が最大となるように、DEN 投与の 18 時間前に部分肝切除を施し、それにより得られた切除肝よりゲノム DNA を抽出して、*gpt assay* を実施した。DEN 投与 1 週間後に被験物質の投与を再開し、試験開始 13 週間後に動物を屠殺・解剖した。解剖時、残存肝組織の一部を 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬固定し、残りの組織を遺伝子解析用に液体窒素で急速凍結し保存した。ホルマリン固定した残存肝組織を用いて常法に従いパラフィン標本作製し、全例について抗 GST-P 抗体を用いた免疫組織化学染色を施して GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。また ES 群および AA 群については、残存肝における肝細胞の細胞増殖活性を評価する目的で、パラフィン標本において抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織化学染色を実施して PCNA 陽性細胞率を算出し、さらに凍結サンプルより total RNA を抽出し、リアルタイム PCR により細胞周期関連遺伝子である *Cyclin A2*, *Cyclin B1*, *Cyclin E1* および *E2f1* の mRNA 発現量を測定した。リアルタイム PCR の内在性コントロールには、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) を用いた。

（倫理面への配慮）

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、

動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。

C. 研究結果

切除肝における *gpt* assay の結果を Table 1 に示す。ES 群および AA 群において対照群と比較して *gpt* 変異体頻度 (MF) の有意な上昇がみられた。変異スペクトラム解析では、対照群と比較して ES 群において A:T-C:G transversion および A:T-G:C transition 変異頻度の有意な上昇がみられ、AA 群においては A:T-T:A transversion の有意な上昇が認められた (Table 2)。GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果を Fig. 1 および Fig. 2 に示す。ES 群における GST-P 陽性細胞巢の数および面積、BNF 群および BT 群における GST-P 陽性細胞巢の数が対照群と比して有意な高値を示した。また、BNF 群および BT 群における GST-P 陽性細胞巢の面積は、有意差は認められなかったものの、対照群と比較して明らかな増加を示した。PCNA 免疫染色の結果、ES 群では対照群と比して PCNA 陽性細胞率の有意な増加が認められた一方で、AA 群においては対照群と比較して差はみられなかった (Fig. 3A および Fig. 4)。リアルタイム PCR の結果を Fig. 3B に示す。検索したいずれの遺伝子においても、ES 群において対照群と比して有意な mRNA 発現量の増加を認めた一方で、AA 群においては対照群と比較して差はみられなかった。

D. 考察

本研究は、*gpt* delta ラットを用いた肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試

験法の開発を目的とし、既知の遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質及び非遺伝毒性肝発がん物質を用いて、昨年度までの研究により樹立した改良プロトコルを用いた新規試験法の有用性について検証した。

その結果、切除肝における *gpt* assay では ES 群および AA 群において *gpt* MF の有意な上昇がみられ、残存肝における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析では ES 群、BNF 群および BT 群において GST-P 陽性細胞巢の有意な増加を認めた。これらの結果は、それぞれの発がん物質の Mode of Action を反映しているものと考えられた。

また、AA は非発がん標的臓器である肝臓において *in vivo* 変異原性を示したことに着目し、切除肝において同様に *in vivo* 変異原性を示した肝発がん性を有する ES 群の結果と比較した。変異スペクトラム解析において、ES 群では A:T-C:G transversion および A:T-G:C transition 変異頻度の有意な上昇がみられ、これらの結果は ES 投与によってラット肝臓に形成される DNA 付加体内、deoxyadenosine 付加体が遺伝子突然変異に寄与している可能性を示していると考えられた。一方、AA 投与によりラット肝臓において形成される AA 特異的 DNA 付加体は、主に deoxyadenosine 付加体であることが知られており、本研究においても AA 群では A:T-T:A transversion 変異頻度の有意な上昇がみられた。また、AA は発がん標的臓器である腎臓においても、AA 特異的 deoxyadenosine 付加体を形成し、同様の遺伝子突然変異を誘発するという報告がある。従って、ES あるいは AA を投与されたラットの肝臓と AA を投与されたラットの腎臓

における遺伝毒性発現機序に大きな差異はないものと考えられた。そこで、過去に実施された網羅的遺伝子発現解析の結果から、AA を投与されたラットにおいて、腎臓で発現上昇のみられた細胞周期関連遺伝子の数が肝臓と比較して多かったという事実を踏まえ、細胞周期関連因子をより詳細に両群間で比較した。ES 群および AA 群の残存肝において *Cyclin A2*, *Cyclin B1*, *Cyclin E1* およびその転写因子である *E2f1* の mRNA 発現量を測定した結果、何れの遺伝子においても、ES 群では有意な上昇を示したが、AA 群では変化がみられなかった。また、肝細胞の PCNA 陽性細胞率も ES 群においてのみ有意な上昇を示した。以上より、肝臓において AA は ES と同様に変異原性を示すものの、細胞増殖活性を亢進させないことが明らかとなった。遺伝子突然変異の生じた細胞が腫瘍細胞に形質転換するためには、細胞分裂による変異の固定が必須であると考えられている。本実験でも示された通り、AA 単独投与により肝臓における GST-P 陽性細胞巢の増加は観察されないことが知られているが、AA を投与後、肝プロモーター物質を処置することにより、GST-P 陽性細胞巢の形成が促進されたという報告もある。以上より、AA が肝臓において細胞増殖亢進作用を有していないことが AA の肝臓における非発がん性の一因である可能性が示された。

本試験法においては化学物質の *in vivo* 変異原性およびプロモーション活性の評価に加え、切除肝組織あるいは残存肝組織を用いて発がんに関連する種々のパラメータを追加検索することにより、より詳細な発がん機序の解析も可能となることが考えられ

た。さらに本試験法においては、遺伝毒性は示すものの発がん性は示さない、いわゆる潜在性発がん物質の検出にも有用であることが示された。

E. 結論

肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法として、*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性および発がん性を同時に検出可能な新規肝短期発がん性試験法の開発を目指し、種々の既知発がん物質を改良プロトコールを用いた新規試験法に適用して検証した結果、その有用性が証明された。さらに、本試験法においては *in vivo* 変異原性およびプロモーション活性の評価に加え、発がんに関連する種々のパラメータを追加検索することにより、より詳細な発がん機序の考察が可能となることが考えられた。また、本試験法は潜在性発がん物質の検出にも有用であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 学会発表

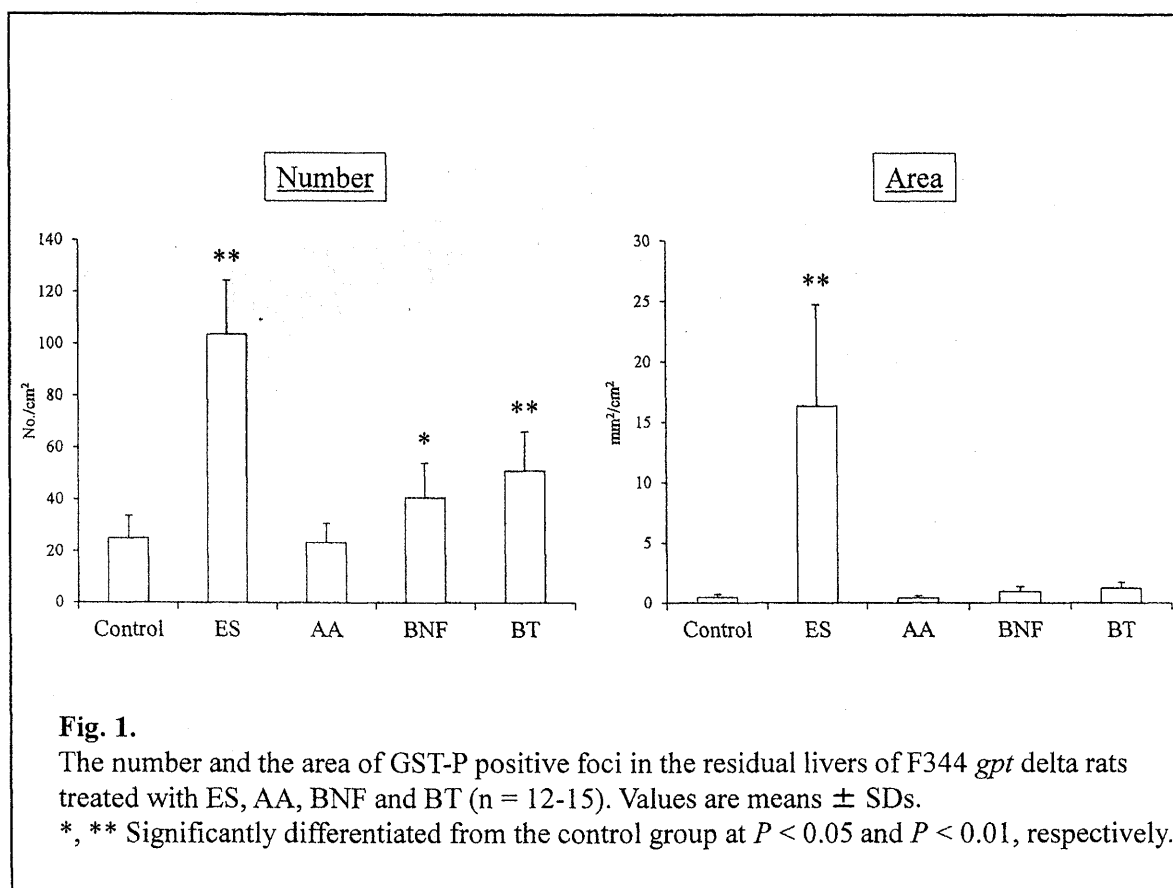
1. 松下幸平、木島綾希、石井雄二、高須伸二、金美蘭、黒田頭、増井則夫、能美健彦、小川久美子、西川秋佳、梅村隆志：レポーター遺伝子導入ラットを用いた短期発がん物質検出モデルの開発。日本毒性学会第 39 回大会（仙台, 2012. 07）
2. Kohei Matsushita, Yuji Ishii, Shinji Takasu, Ken Kuroda, Aki kijima, Takehiko Nohmi, Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa, Takashi Umemura: A medium-term animal model using

gpt delta rats for predicting chemical carcinogenicity and related mechanisms of action. SOT 2013 (San Antonio, 2013. 03)

G-2. 発表論文

1. Kohei Matsushita, Ken Kuroda, Yuji Ishii, Shinji Takasu, Aki Kijima, Hiroaki Kawaguchi, Noriaki Miyoshi, Takehiko Nohmi, Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa, Takashi Umemura: 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: 313-321.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし



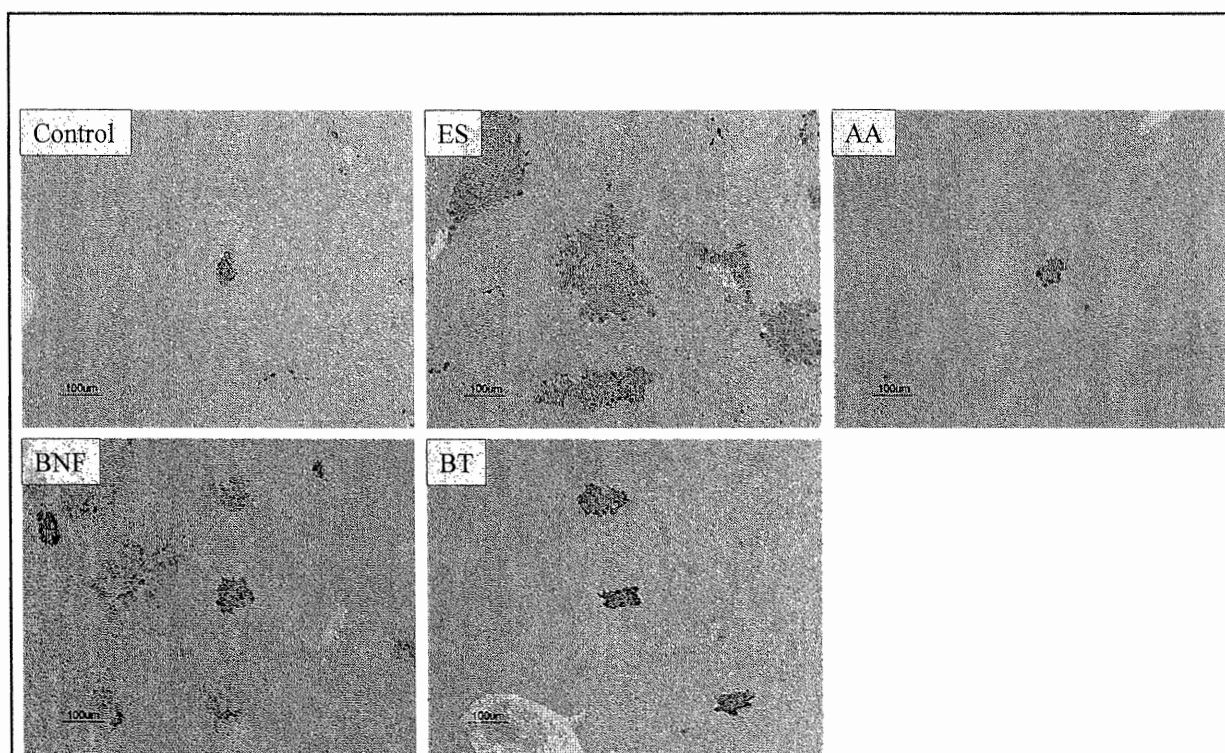


Fig. 2. Representative photographs of GST-P immunohistochemistry in the residual livers of F344 *gpt* delta rats treated with ES, AA, BNF and BT.