

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
平成 29 年度分担研究報告書

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）
分担研究項目：遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 准教授

研究要旨

本研究は化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化を可能とする評価モデルの構築を目的とし、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立および検証を行った。3種類の遺伝毒性肝発がん物質及び7種類の非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、投与24時間後の肝臓におけるマーカー遺伝子（10遺伝子）の発現データをqPCRで取得し、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いて肝発がん性を予測した。その結果、全ての遺伝毒性肝発がん物質（3物質）について陽性判定が得られ、また、すべての非遺伝毒性非発がん物質で陰性判定が得られた。以上の結果から、本肝発がん性予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を高い精度で検出できる可能性が示唆された。

A．研究目的

生活環境を取り巻く化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に検証できるシステムの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、システムで得られた結果は国民生活の安全・安心を保障する重要な基盤となる。本研究では化学物質の発がん性評価の迅速化・高精度化・標準化を目的に、平成23年度～28年度「化学物質の安全性と発がん性リスク評価としての短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究」（吉見班）で蓄積してきた病理組織発がんマーカー及び試験法をより一層発展・高精度化し、高精度発がん評価モデルとして確立する。さらに国際的に認知させる必要があるため、それらの発がん性評価法のOECDテストガイドライン化を目指すことが重要である。そこで、本申請研究においては、OECDテストガイドライン化の成立を最終目的として、6研究施設による協同体制にて下記に記す三つの研究を実施する。第一に、膀胱を標的とする発がん物質を用いた28日間反復投与試験及び大腸を標的とする発がん物質を用いた90日間反復投与試験を実施し、病理組織発がんマーカーを用いた大腸及び膀胱発がんリスク評価法を確立する。第二に、これまで開発した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性をより一層検証し、確立する。第三に、上記の試料を用いてDNA付加体を網羅的に解析しカタログ化する方法（アダクトーム解析）による化学物質のDNA損傷を指標とした遺伝毒性評価法を開発する。

本研究の意義は、成果となる発がん性評価法及びガイドラインが、化学物質の有害性評価において汎用的に用いられかつ厚生労働行政施策の科学的基盤となることであり、得られた発がん性に関する情報は厚生労働行政施策への活用が非常に期待できる。また、得られる成果は国内のみならず、化学物質の安全性評価に係る国際的な試験法やガイドライン等への活用

も期待される。

平成29年度は、我々が構築した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルを確立するために、3種類の遺伝毒性肝発がん物質及び7種類の非遺伝毒性非発がん物質について、ラット単回投与試験を行い、得られた遺伝子発現データを予測モデルに入力し、判定を行った。

B．研究方法

遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質10種類について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。実験動物は6週齢の雄SDラットを用いた。動物試験プロトコールは事前に共有・配布し、プロトコールに従い試験を実施した。被験物質と投与濃度（各物質のLD50の1/3）表1の通りである。

被験物質投与後24時間後に剖検を行った。肝臓を摘出し、RNA抽出用として、外側左葉(LL)を摘出後、下端辺縁部を約2cm×0.5cmの大きさで2スライス切り出し、それぞれ1mLのRNAlaterが入った1.5mLチューブへ移した（合計2本、そのうち1本は、他施設でのバリデーション用）。1.5mLチューブを4℃で一晩保管後、-80℃へ長期保管した。凍結保存サンプル用として、外側左葉の上半分を1.5mLチューブ2本分採取し、液体窒素により凍結後、-80℃凍結保管した（一本はDNA adduct解析用）。ホルマリン固定用サンプルとして、外側左葉の下半分、内側右葉(RM)及び右葉尾部(R2)から計3スライス切り出し、カセットにおいて10%ホルマリンにて固定した。

遺伝子発現については、リアルタイムPCRにてデータを取得した。リアルタイムRT-PCRは施設共通のプロトコールに従って行った。肝臓からのtotal RNA抽出とcDNAの合成はそれぞれRNeasy mini kit（キアゲン）とSuper Script VI VIL0 Maste Mix(invitrogen）のキ

ットを使用した。

各施設で得られた遺伝子発現データを我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（サポートベクターマシンによる数理的アルゴリズムによるモデル）に入力し、判定を行った。

（倫理面への配慮）

各施設の動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

C. 研究結果

取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った(表 1)。本モデルでは、遺伝毒性肝発がん物質を「陽性」、その他の物質（非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の発がん物質、非発がん物質）を「陰性」と判定する。その結果、全ての遺伝毒性肝発がん物質(3 物質)について陽性判定が得られ、遺伝毒性陰性の非発がん物質 7 物質すべてで陰性判定が得られた。

表 1 遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた判定結果

	被検物質	投与量 (mg/kg)	判定結果
Ames(+) 肝発がん物質	2-Nitropropane (2-NP)(陽性対照物質)	240	Positive
	o-Aminoazotoluene (AAT)	500	Positive
	N-Nitrosodimethylamine (DMN)	10	Positive
	4,4'-Thiodianiline (TDA)	300	Positive
Ames(-) 臓器発がん性 (-)	Diazepam (DZP)	80	Negative
	Disulfiram (DSF)	170	Negative
	Phenytol (PHE)	550	Negative
	Rotenone (ROT)	20	Negative
	Tolbutamide (TLB)	830	Negative
	Aspirin (ASA)	70	Negative
	Triamterene (TRI)	130	Negative

D. 考察

すべての被験物質について誤りなく判定されており、本遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた判定方法は遺伝毒性発がん物質の検出に有用と期待される。

E. 結論

我々が構築した遺伝子セットを用いた肝発がん性予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を高い精度で検出できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tachibana H, Gi M, Kato M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers. *Cancer Sci*, 108, 331-337, 2017.
- 2) Yamaguchi T, Gi M, Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp Toxicol*

Pathol. 69, 1-7, 2017.

- 3) Ishii N, Gi M, Fujioka M, Yamano S, Okumura M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid exerts promotion effects on hepatobiliary carcinogenesis in a rat medium-term multiorgan carcinogenicity bioassay. *J Toxicol Pathol.* 30, 39-45, 2017.
- 4) Doi K, Fujioka M, Sokuza Y, Ohnishi M, Gi M, Takeshita M, Kumada K, Kakehashi A, Wanibuchi H. Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis. *In Vivo.* 31, 187-197, 2017.
- 5) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Doi K, Okuno T, Kakehashi A, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 104 weeks. *J Toxicol Sci.* 42, 475-483, 2017.
- 6) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Fukushima S, Wanibuchi H. Progression of Hepatic Adenoma to Carcinoma in *Ogg1* Mutant Mice Induced by Phenobarbital. *Oxid Med Cell Longev.* 2017:8541064, 2017.
- 7) Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. Enhanced Susceptibility of *Ogg1* Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 18, pii: E1801, 2017.

2. 学会発表

- 1) 鰐淵英機、魏 民、藤岡正喜、梯アンナ. ヒ素の発がんリスク評価. 第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2017 年 7 月)
- 2) 藤岡正喜、魏 民、河内聡子、梯アンナ、鰐淵英機. 1,2-ジクロロプロパンおよびジクロロメタン複合曝露によるマウス肝臓への影響. 第 44 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2017 年 7 月)
- 3) 奥野高裕、梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機. NASH モデルマウスを用いた肝細胞癌の発がんメカニズム解析. 第 32 回発癌病理研究会、滋賀 (2017 年 8 月)
- 4) 香山侑弘、魏 民、藤岡正喜、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. BBN 誘発マウス膀胱がんにおける *Ink4a/Arf* の役割の検討. 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 5) 魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、香山侑弘、熊田賢次、鰐淵英機. BBN 誘発マウス膀胱発がんモデルにおける Acetazolamide の抑制効果の検討. 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 6) 藤岡正喜、魏 民、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. CD1 マウスにおけるジメチル

- アルシン酸(DMA)の胎児期ばく露による発がん性 . 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
- 7) 梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機 . 非アルコール性脂肪肝炎の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析 . 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川 (2017 年 9 月)
 - 8) 藤岡正喜、魏 民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機 . マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序 . 第 23 回ヒ素シンポジウム、茨城 (2017 年 12 月)
 - 9) 魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機 . 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の開発 . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
 - 10) 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機 . 2 つの NASH モデルマウスにおける病理組織学的所見の違い . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
 - 11) 藤岡正喜、魏 民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機 . マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序 . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
 - 12) 梯アンナ、奥野高裕、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機 . NASH の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析 . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
 - 13) 熊田賢次、奥野高裕、魏 民、藤岡正喜、行松直、梯アンナ、鰐淵英機 . 0-Acetoacetoluidide(AAOT)の毒性影響の検討 . 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
 - 14) 熊田賢次、藤岡正喜、魏 民、大石裕司、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機 . マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序 . 第 17 回分子予防環境医学研究会、三重 (2018 年 2 月)

G. 知的所有権の取得状況

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