

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 横平 政直 香川大学 准教授

研究要旨

平成 29 年度年度は、TGP 由来ラット肝臓遺伝子発現データをもとに構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVM モデル）の検出力を検証するため、4 種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、24 時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。その結果、遺伝性発がん物質である 4 物質は遺伝性発がん物質と判定され、非遺伝性発がん物質のうち ethionamide 以外の 6 物質は非遺伝性発がん物質と判定された。ethionamide は高用量で遺伝毒性を発揮する報告がある。この遺伝子セットを用いた判定方法は遺伝毒性発がん物質の検出への有用性が確認された。

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。本研究では化学物質の発がん性評価の迅速化・高度化・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および試験法をより一層精度化し、確立する必要がある。さらに国際的に認知させる必要があるため、その 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目指して、6 研究施設による協同体制にて研究を実施する。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。本研究の特色は化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に予測できる評価法及びヒトへの外挿に必要な発がんメカニズムに関する情報が得られる試験系を確立することにある。さらに、多施設協同研究で多数の化学物質を同時に評価することにより、評価法の標準化を推進し、国際動向を見据えた OECD テストガイドライン化を実現するのが本研究の独創的な点である。

平成 29 年度年度は、TGP 由来ラット肝臓遺伝子発現データをもとに構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVM モデル）の検出力を検証するため、4 種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、24 時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。

B．研究方法

日本チャールズリバー社（神奈川県厚木）より購入した 4 週齢の SD ラット（雄性）について、2 週間の

馴化期間の後に実験を開始した。群構成は表 2 の通りで、体重測定を行い、各群の平均体重にばらつきがないよう群分けを行った。平成 29 年度で、遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の発がん物質 20 種類について、ラット単回投与試験（剖検は投与 24 時間後）を行い、得られた肝組織から遺伝子発現データを取得する。動物試験は 3 施設（担当：鰐淵/魏、塚本、横平）で行われたが、当施設では被験物質として、遺伝毒性肝発がん物質を 4 種類、非遺伝毒性肝発がん物質を 7 種類について検討した（表 1）。群構成が多くなったため、実験は 2 回に分けて行った（実験 1 および実験 2）。動物試験プロトコルは事前に共有・配布し、プロトコルに従い試験を実施した。遺伝子発現については、リアルタイム PCR でのデータを取得した実験開始時に、体重測定を行いながら体重当たりの投与量に調整した被験物質を各動物に強制胃内投与した。被験物質の投与濃度は表 3 の通りである。被験物質投与後 24 時間後に剖検を行った。剖検は、イソフルラン（abbvie #B506）吸入麻酔後、腹部大動脈から自然放血により安楽死させた。安楽死後、開腹し、臓器に肉眼的異常の有無を観察した。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 RNA later 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、RNA 抽出用に採材した後の残りの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、ディープフリーザーにて凍結保管した（一本は DNA adduct 解析用）。ホルマリン固定用サンプルは、外側左葉の下半分、内側右葉(RM)および右葉尾部(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。

リアルタイム RT-PCR については施設共通のプロトコルに従って行った。具体的には、肝臓からの total RNA 抽出は RNeasy mini kit（キアゲン）を使用し、

3mm×3mm 程度の肝組織片から total RNA を抽出した。30uL の Rnase free H2O で溶出した。cDNA の合成は Super Script VI VIL0 Maste Mix(invitrogen) のキットを使用し、total RNA 1000 ng とした。逆転写反応は、total 20uL の volume で行った。サーマルサイクラーによる反応は、25 :10min、50 :10min、85 :5min、4 : とした。QPCR 用サンプルは「RT 反応液 (20ul)+ MilliQ 80 ul=100 ul」で調整した。TaqMan Fast Universal PCR Master Mixes (サーモフィッシャー)を使用し、リアルタイム PCR 反応をおこなった。

(倫理面への配慮)

いずれの動物実験も実験に先立ち、香川大学、動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、その許可を得た後に総合生命科学センター、同実験部門において香川大学動物実験規程に従って飼育管理した。

C. 研究結果

実験 1 では動物は全匹とも死亡例はなく、外見にも以上は認めなかった。実験 2 では外見に以上は認めなかったが、被験物質投与後 24 時間後に 2-Nitrosopropane 群の 1 匹、3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene の 3 匹の死亡が確認された。

肝臓の病理組織所見では、2-Nitrosopropane 群(実験 1 および実験 2)はうっ血、門脈域を中心とする炎症細胞浸潤(多形核白血球、リンパ球)を認めた。匹中 3 匹が死亡した 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene 群(9 群)は、肝組織に著変は見られなかった。その他の群では、陰性対照群とくらべて、わずかな炎症細胞浸潤～変化は乏しい印象であった。

リアルタイム RT-PCR の結果を代表研究者に送った。遺伝子発現データを構築済の肝発がん性予測モデル(サポートベクターマシーンによる数理的アルゴリズムによるモデル)に入力し、肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った(表 4)。その結果、非遺伝性発がん物質の ethionamide が遺伝性発がん物質として判定された。それ以外の被験物質については、遺伝性発がん物質である 4 物質は遺伝性発がん物質と判定され、非遺伝性発がん物質のうち ethionamide 以外の 6 物質は非遺伝性発がん物質と判定された。

D. 考察

今回、非遺伝性毒性発がん物質である ethionamide が遺伝性毒性物質として判定された。*in vitro* 遺伝毒性試験では毒性を引き起こす用量で遺伝毒性陽性があるという報告がある(Kirkland et. al., 2016)。今回の投与量は LD50 の 1/3 量という高い投与量であった。このため、ethionamide が遺伝毒性作用を発揮したと推測される。その他の被験物質については誤りなく判定されており、この遺伝子セットを用いた判定方法は遺伝性発がん物質の検出に有用と期待される。

E. 結論

今回、遺伝子セットを用いた判定方法により、遺伝性毒性発がん物質が正確に判定されており、この方法は遺伝性毒性発がん物質の検出に有用であることが確認された。

(F. 健康危険情報 なし)

G. 研究発表

1. 論文発表

Yokohira M, Nakano-Narusawa Y, Yamakawa K, Hashimoto N, Yoshida S, Kanie S, Imaida K. Validating the use of napsin A as a marker for identifying tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in rodents. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 69(8): 637-642, 2017.

2. 学会発表

肺胞サーファクタントの役割と発癌リスク評価への応用、横平政直、第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会(日本毒性病理学会、沖縄、2018.01)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 今回の検討で用いた被験物質についての情報

CAS. No			品番	
遺伝毒性肝発がん物質				
924-16-3	東京化成	Nitrosodibutylamine	N0375	N-ニトロソジブチルアミン 5ml
930-55-2	シグマアルドリッチ	N-Nitrosopyrrolidine (遮光)	158240-10G	1-Nitrosopyrrolidine 10g (遮光)
55-80-1	東京化成	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene ^s	M0207	4-(Dimethylamino)-3'-methylazobenzene 25g
79-46-9	東京化成	2-Nitrosopropane (2-NP)	N0249	2-Nitropropane 25g
非遺伝毒性非肝発がん物質				
60-87-7	和光純薬工業	Promethazine (PMZ)	160-11642	プロメタジン塩酸塩 25g
38194-50-2	和光純薬工業	Sulindac (SUL)	190-12701	スリンダク 10g
60-54-8	シグマアルドリッチ	Tetracycline (TC)	87128-25G	Tetracycline 25g
536-33-4	東京化成	Ethionamide (ETH)	E0695	エチオナミド 5g
58-55-9	和光純薬工業	Theophylline (TEO)	209-09932	テオフィリン 25g
58-08-2	和光純薬工業	Caffeine (CAF)	031-06792	カフェイン 25g
56-75-7	和光純薬工業	Chloramphenicol (CMP)	032-19451	クロラムフェニコール 5g
溶媒	和光純薬工業	0.5% Methyl cellulose (MC)	133-17815	メチルセルロース 500ml

表2 今回の実験における群構成

群構成			LD50 mg/kg (rat)	投与量(1/3 of LD50)
Group	被験物質			
1	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺伝毒性肝発がん物質 (陽性対照)	720	240
2	Nitrosodibutylamine (NB)	遺伝毒性肝発がん物質	1200	400
3	N-Nitrosopyrrolidine (遮光)(NNP)	遺伝毒性肝発がん物質	900	300
4	Promethazine (PMZ)	非遺伝毒性非肝発がん物質	580	190
5	Sulindac (SUL)	非遺伝毒性非肝発がん物質	264	90
6	Tetracycline (TC)	非遺伝毒性非肝発がん物質	807	270
7	0.5% Methyl cellulose (MC)	対照群		5ml/kg b.w.
8	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺伝毒性肝発がん物質 (陽性対照)	720	240
9	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (MDA)	遺伝毒性肝発がん物質	1500	500
10	Ethionamide (ETH)	非遺伝毒性非肝発がん物質	1320	440
11	Theophylline (TEO)	非遺伝毒性非肝発がん物質	225	80
12	Caffeine (CAF)	非遺伝毒性非肝発がん物質	192	60
13	Chloramphenicol (CMP)	非遺伝毒性非肝発がん物質	2500	830
14	0.5% Methyl cellulose (MC)	対照群		5ml/kg b.w.

表3 被験物質の投与量の調整

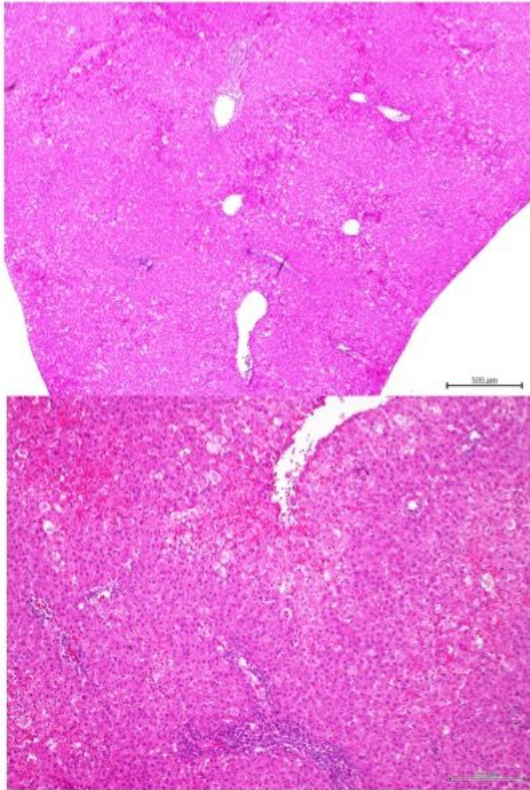
Group	被験物質		LD50 mg/kg (rat, oral)	投与量(1/3 of LD50) (mg/kg b.w)	被験物質質量 (mg)	Volume (5% MC, ml)	投与液濃度 (mg/5ml/kg b.w.)
1	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺肝発がん (陽性)	720	240	480	10	240
2	Nitrosodibutylamine	遺肝発がん	1200	400	800	10	400
3	N-Nitrosopyrrolidine (遮光)	遺肝発がん	900	300	600	10	300
4	Promethazine (PMZ)	非遺非肝発がん	580	190	380	10	190
5	Sulindac (SUL)	非遺非肝発がん	264	90	180	10	90
6	Tetracycline (TC)	非遺非肝発がん	807	270	540	10	270
7	0.5% Methyl cellulose (MC)	対照群		5ml	0	10	
8	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺肝発がん (陽性)	720	240	480	10	240
9	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene ^s	遺肝発がん	1500	500	1000	10	500
10	Ethionamide (ETH)	非遺非肝発がん	1320	440	880	10	440
11	Theophylline (TEO)	非遺非肝発がん	225	80	160	10	80
12	Caffeine (CAF)	非遺非肝発がん	192	60	120	10	60
13	Chloramphenicol (CMP)	非遺非肝発がん	2500	830	1660	10	830
14	0.5% Methyl cellulose (MC)	対照群		5ml	0	10	

表4 肝発がん性予測モデルの結果

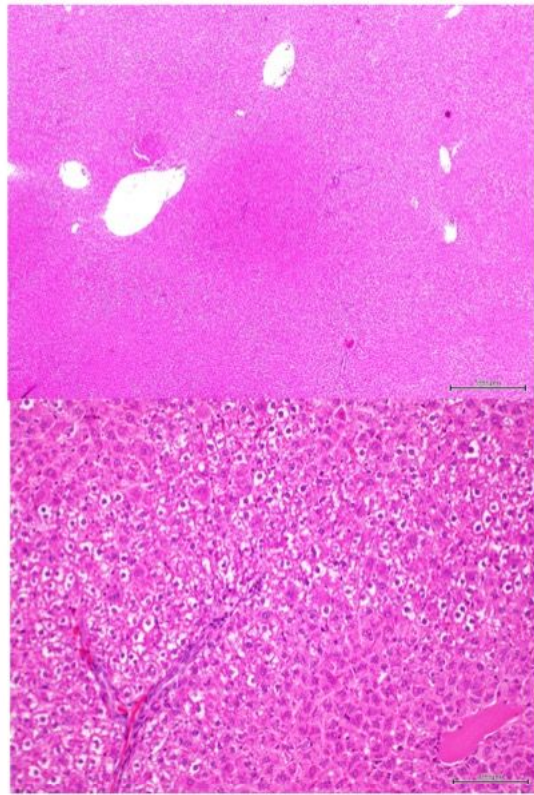
Chemicals	Predicted (Carcinogenicity)
2-Nitrosopropane (Ex 1)	[Positive]
Nitrosodibutylamine	[Positive]
N-nitrosopyrrolidine	[Positive]
Promethazine	[Negative]
Sulindac	[Negative]
Tetracycline	[Negative]
2-Nitrosopropane (Ex 2)	[Positive]
3-Methyl-4-dimethylaminoozobenzene	[Positive]
Ethionamide	[Positive]
Theophylline	[Negative]
Caffeine	[Negative]
Chloramphenicol	[Negative]

図1 肝臓の組織所見（実験1）

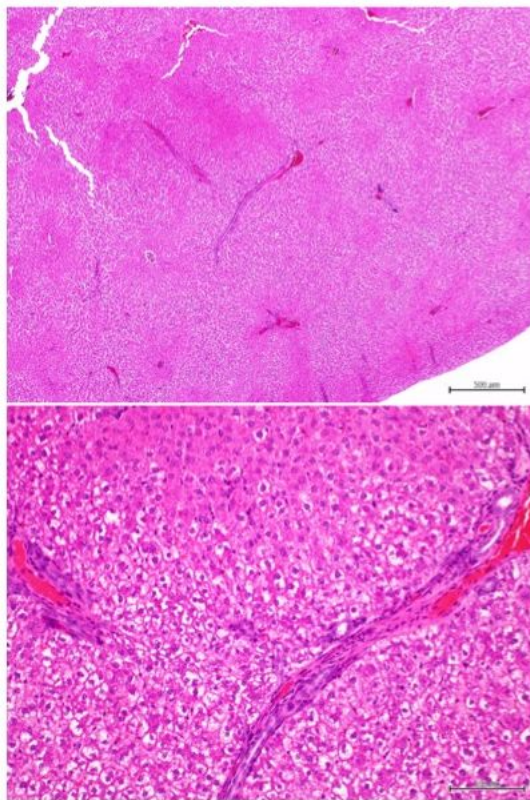
2-Nitrosopropane (2-NP) (実験1)



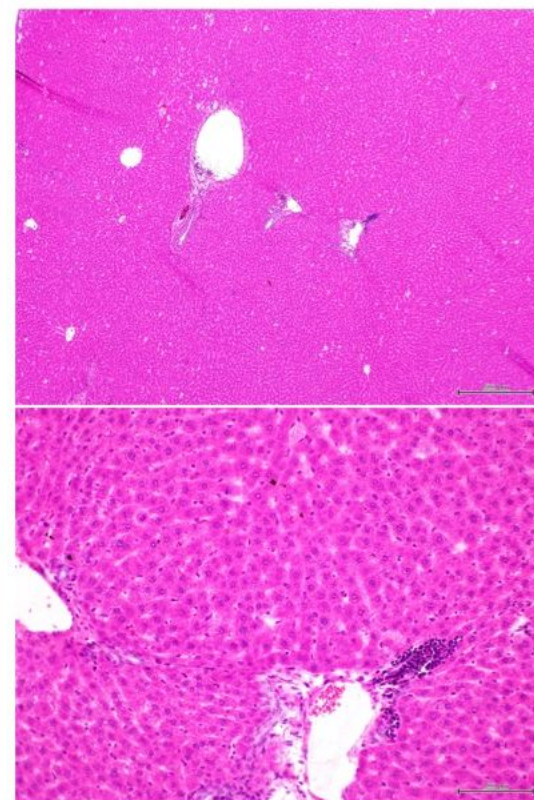
Nitrosodibutylamine (NB)



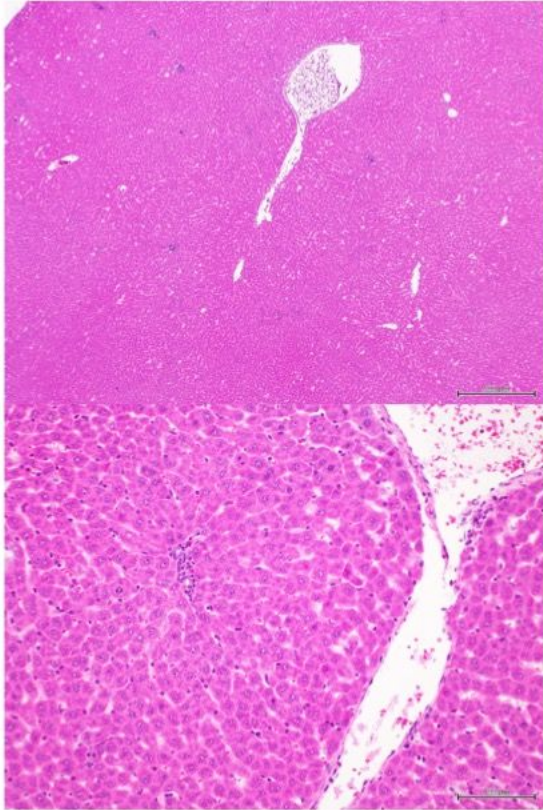
N-Nitrosopyrrolidine (NNP)



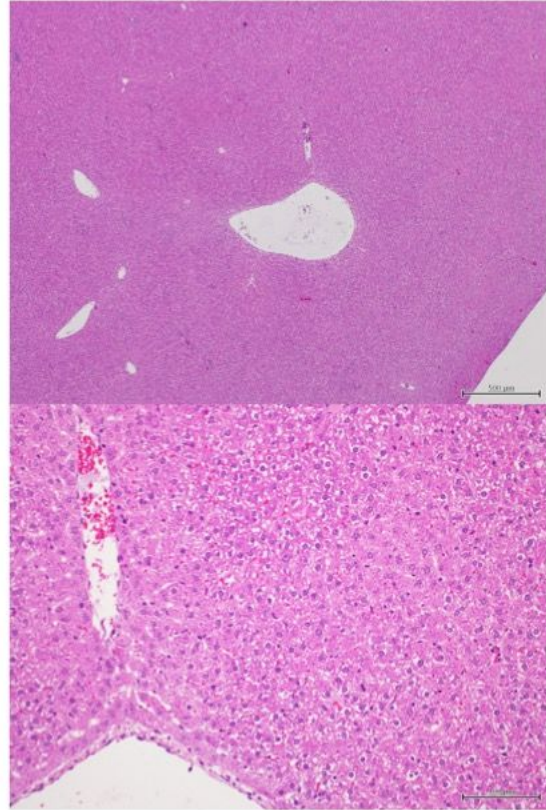
Promethazine (PMZ)



Sulindac (SUL)



Tetracycline (TC)



0.5% Methyl cellulose (MC) (実験1)

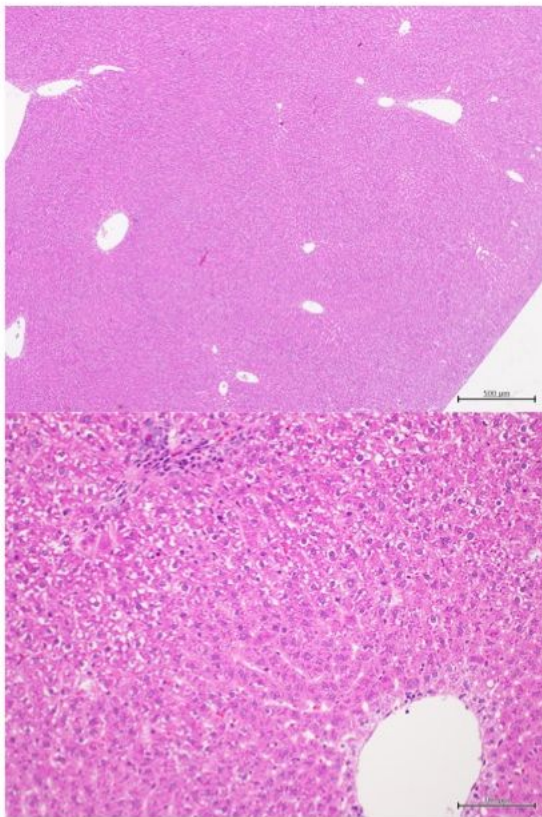
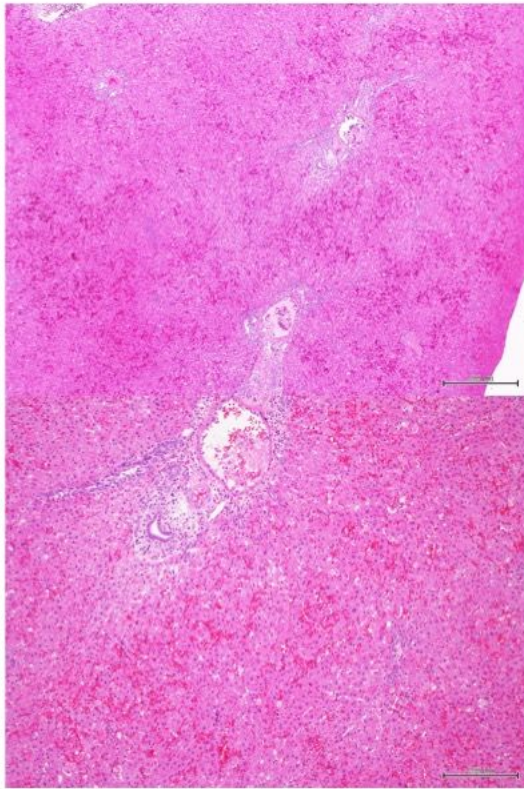
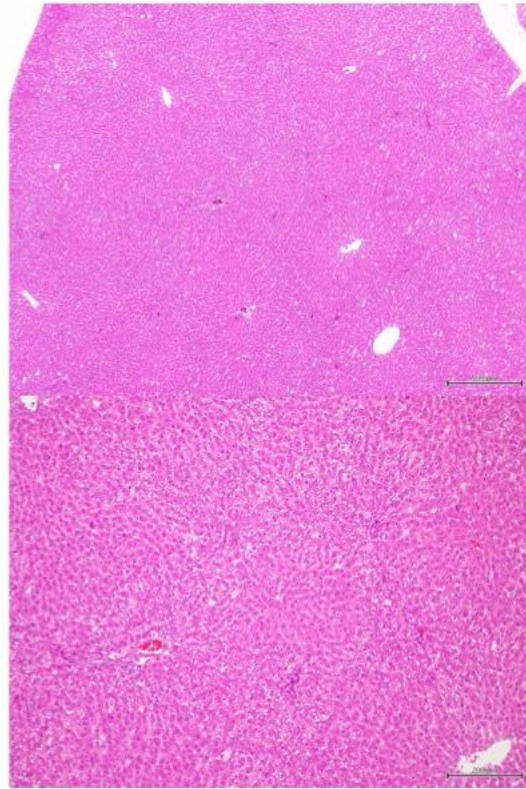


図2 肝臓の組織所見（実験2）

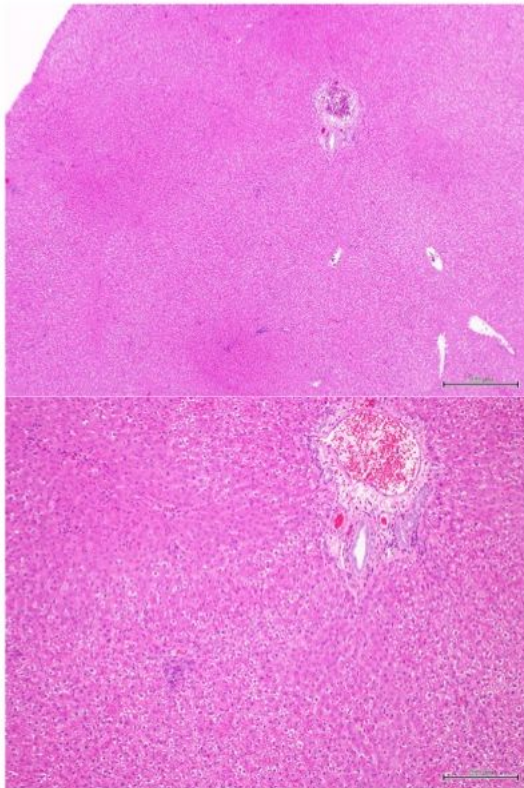
2-Nitrosopropane (2-NP) (実験2)



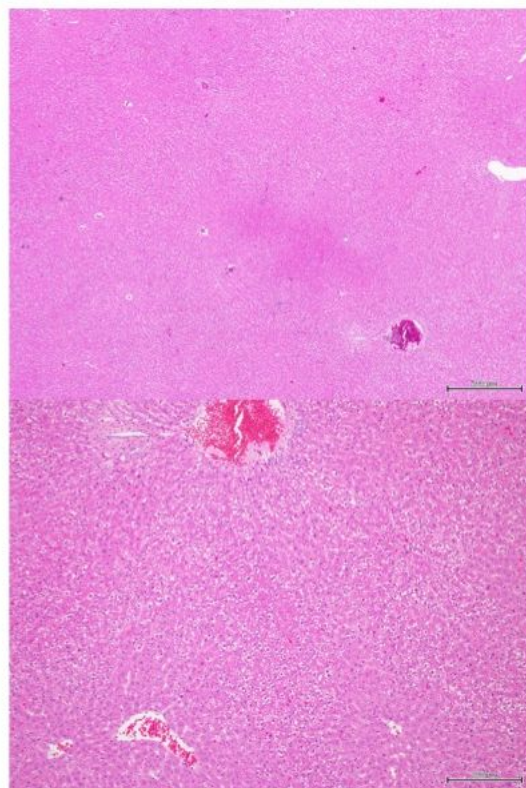
3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene



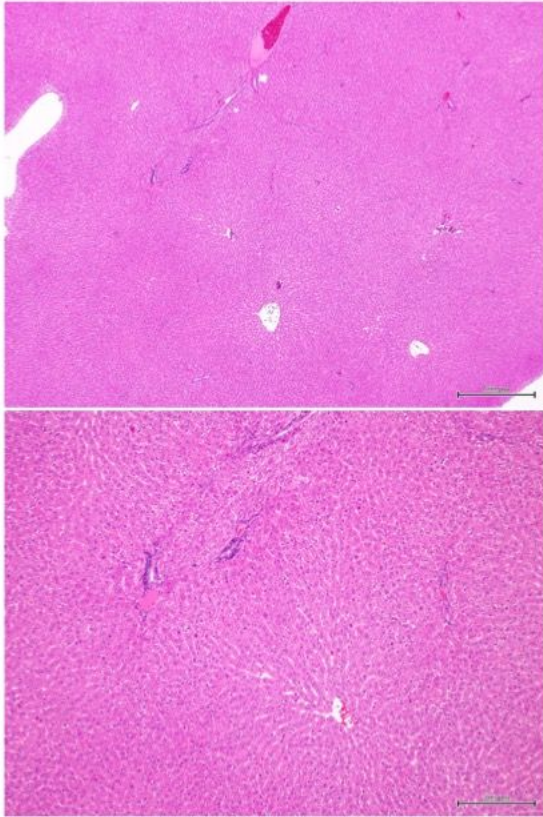
Ethionamide



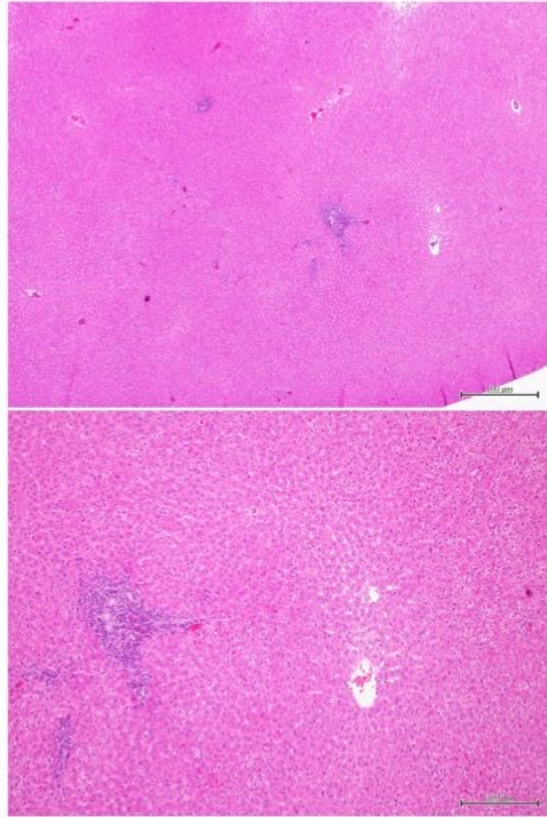
Theophylline



Caffeine



Chloramphenicol



0.5% Methyl cellulose (MC) (実験 2)

