

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 塚本徹哉 藤田保健衛生大学医学部病理診断科 准教授

研究要旨

環境中の化学物質の発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は喫緊の課題である。本研究では、遺伝毒性発がん性マーカーセットにより、遺伝毒性肝発がん性を判定できる 24 時間ラット超短期動物試験系を用い、化学物質の肝発がん性の評価法を検討した。遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質 10 種類(N-Nitrosodiethylamine, N-Nitrosodiethanolamine, N-Nitrosoethylmethylamine, Monocrotaline, Phenobarbital, Cyclophosphamide, Nitrofurantoin, Phenacetin, Indomethacin, Phenylbutazone, 2-Nitropropane)について、6 週齢オス Sprague-Dawley (SD)ラット単回強制胃内投与試験を行い、24 時間後に肝から total RNA を抽出後、real time RT-PCR 法により 10 遺伝子の発現データを取得した。対照群を 0 としたときの Ct 値を用いて、サポートベクターマシーン (SVM)による肝発がん性予測数理学的モデルを用いて解析した結果、概ね、遺伝毒性肝発がん物質とその他の化学物質の分離が可能であった。しかし、Monocrotaline に関しては、従来知見と異なる評価となったため、今後更なる検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

環境中の化学物質の発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は喫緊の課題である。本研究では、トキシコゲノミクス手法から得た遺伝毒性発がん性マーカーセットにより、遺伝毒性・発がん性を判定できるラット超短期動物試験系を用い、化学物質の遺伝毒性・発がん性評価法の確立を目指す。

B. 研究方法

4 種類の遺伝毒性肝発がん物質 (Group 1 (G1): N-Nitrosodiethylamine (NDEA), G2: N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), G3: N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), G4: 2-Nitropropane (2-NP))、2 種類の非遺伝毒性肝発がん物質 (G5: Monocrotaline (MCT), G6: Phenobarbital (PB))、3 種類の遺伝毒性非肝発がん物質 (G7: Cyclophosphamide (CPA), G8: Nitrofurantoin (NFT), G9: Phenacetin (PCT))、2 種類の非遺伝毒性非肝発がん物質 (G10: Indomethacin (IM), G11: Phenylbutazone (PhB)) および対照群 (G12: 0.5% Methyl cellulose (MC)) について、6 週齢オス Sprague-Dawley (SD)ラット単回強制胃内投与試験（各群 5 匹）を行い、24 時間後に剖検を行い、得られた肝組織の一部を凍結保存した（大阪市大、魏博士ら）。藤田保健衛生大学にて、肝組織から total RNA を抽出 (RNeasy mini kit, QIAGEN) 後、cDNA を作製 (SuperScript IV VIL0 Mater Mix, ThermoFisher) した。18S rRNA を内部標準として

(Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control, ThermoFisher) 既に魏博士らが予備的検討を行った 10 遺伝子について、real time RT-PCR 法により遺伝子発現データを取得した。結果は、対照群を 0 としたときの Ct 値で表した。その値を、大阪市大で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 (SVM)による数理学的アルゴリズムによるモデル）に入力し、遺伝毒性肝発がん性の評価を行った。

C. 研究結果

G12 を 0 とした時の 10 遺伝子 (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) の Ct 値は、それぞれ以下の通りであった。
G1: 5.2, 3.4, 1.5, 4.0, 5.3, 2.1, 2.4, 2.0, 2.7, -2.7; G2: 3.7, 2.2, 1.0, 2.8, 2.8, 1.2, 1.1, 1.1, 1.7, -0.7; G3: 7.4, 5.1, 2.1, 5.4, 6.1, 3.1, 3.3, 2.8, 4.1, -1.7; G4: 4.0, 4.8, 1.4, 4.1, 3.9, -1.3, 1.8, 0.9, 3.2, -3.2; G5: 3.9, 1.8, 0.6, 1.7, 2.4, -0.4, 0.6, 0.5, 0.9, -0.8; G6: 1.2, 0.5, 0.3, 0.2, 0.4, -0.8, 0.6, 0.4, 1.1, -0.0; G7: 2.6, 1.3, 1.2, 1.6, 0.9, 1.1, 0.8, 0.9, 0.8, 1.0; G8: 0.0, 0.9, 0.4, 0.5, -0.1, 0.4, 0.4, 0.4, 0.2, 0.2; G9: -1.0, 0.5, 0.9, -0.0, -0.3, -0.4, 0.1, 0.1, -0.2, 0.2; G10: -1.1, -0.5, 0.1, 0.3, -1.2, -0.8, -0.3, -0.3, -0.8, -0.7; G11: -0.1, 0.7, 0.2, 0.4, 0.3, 0.0, 0.2, 0.3, 0.3, 0.1. F, J 以外は、G1-G7 で G12 より陽性の値が得られ、特に G1-G5 で高値であった。SVM による解析の結果では、G1-G5 が陽性、G6-

G11 が陰性と評価された。

D . 考察

SVM による予測モデルによる解析の結果、NDEA, NDELA, NEMA, 2-NP, MCT が陽性、PB, CPA, NFT, PCT, IM, PhB が陰性と判定された。4 種類の遺伝毒性肝発がん物質 (NDEA, NDELA, NEMA, 2-NP) については正しく評価された。MCT は非遺伝毒性肝発がん物質であったが、陽性との判定であった。他の非遺伝毒性肝発がん物質 (PB)、遺伝毒性非肝発がん物質 (CPA, NFT, PCT)、非遺伝毒性非肝発がん物質 (IM, PhB) については予測通りに陰性と評価された。

E . 結論

24 時間という超短期間で、10 遺伝子の発現量の変動を解析することにより、概ね遺伝毒性肝発がん性の予測が可能なモデルの構築が可能と判断された。従来知見と異なる評価となったものがあつたが、今後更なる検討が必要と考えられた。

G . 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tsukamoto, T, Nakagawa, M, Kiriya, Y, Toyoda, T, Cao, X. Prevention of Gastric Cancer: Eradication of Helicobacter Pylori and Beyond. Int J Mol Sci 18, E1699, 2017.

- (2) Tahara, S, Tahara, T, Tsukamoto, T, Horiguchi, N, Kawamura, T, Okubo, M, Ishizuka, T, Nagasaka, M, Nakagawa, Y, Shibata, T, Kuroda, M, Ohmiya, N. Morphologic characterization of residual DNA methylation in the gastric mucosa after Helicobacter pylori eradication. Cancer Med 6: 1730-1737, 2017.

2. 学会発表

- (1) 岡部麻子、桐山諭和、鈴木周五、櫻井浩平、高橋智、塚本徹哉、DNA 二重鎖切断マーカー -H2AX を用いた胃発がん物質の短期同定、日本毒性病理学会、2018 年 1 月 (沖縄)

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。