

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

研究代表者 鰐淵英機 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 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開発および検証を行った。遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質 30 物質についてラット単回投与を行い、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（9 物質）について陽性判定が得られ（感度 100%）、その他の 21 物質中 19 物質で陰性判定が得られた（特異度 90.5%）。以上の結果から、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。

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。

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、9 種類の遺伝毒性肝発がん物質及び 21 種類のそれ以外の化合物（非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の遺伝毒性および非遺伝毒性発がん物質、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 30 種類について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。動物試験および遺伝子解析は 3 施設（香川大・藤田保健衛生大・大阪市立大）で行われた。

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学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

各施設で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（9 物質）について陽性判定が得られ（感度 100%）、遺伝毒性陰性の非発がん物質 21 物質のうち、ethionamide と Monocrotaline を除く 19 物質で陰性判定が得られた（特異度 90.5%）。

D．考察

遺伝毒性陰性の非発がん物質 ethionamide が遺伝毒性物質として判定されたが、*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であったと

報告がある。今回の投与量はLD50の1/3量という高い投与量であったため、ethionamideが遺伝毒性作用に関連する遺伝子の変動を惹起したと推測される。Monocrotaline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ため、今後更なる検討が必要と考えられた。その他の被験物質については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。

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
	Nitrosodibutylamine (DBA)	400	Positive
	N-Nitrosopyrrolidine (NPYR)	300	Positive
	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (DMAB)	500	Positive
	N-Nitrosodiethylamine (NDEA)	70	Positive
	N-Nitrosodiethanolamine (NDELA)	2000	Positive
	N-Nitrosoethylmethylamine (DEMA)	30	Positive
Ames(-) 臓器発がん性 (-)	Diazepam (DZP)	80	Negative
	Disulfiram (DSF)	170	Negative
	Phenytoin (PHE)	550	Negative
	Rotenone (ROT)	20	Negative
	Tolbutamide (TLB)	830	Negative
	Aspirin (ASA)	70	Negative
	Triamterene (TRI)	130	Negative
	Promethazine (PMZ)	190	Negative
	Sulindac (SUL)	90	Negative
	Tetracycline (TC)	270	Negative
	Ethionamide (ETH)	440	Positive
	Theophylline (TEO)	80	Negative
	Caffeine (CAF)	60	Negative
	Chloramphenicol (CMP)	830	Negative
	非遺伝毒性肝発がん物質	Monocrotaline (MCT)	20
Phenobarbital (PB)		50	Negative
Ames(+) 肝以外の臓器発がん性	Cyclophosphamide (CPA)	30	Negative
	Nitrofurantoin (NFT)	200	Negative
Ames(-) 肝以外の臓器	Phenacetin (PCT)	550	Negative
	Indomethacin (IM)	1	Negative
	Phenylbutazone (PhB)	80	Negative

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) Kakehashi A, Stefanov VE, Ishii N, Okuno T, Fujii H, Kawai K, Kawada N, Wanibuchi H. Proteome Characteristics of Non-Alcoholic Steatohepatitis Liver Tissue and Associated Hepatocellular Carcinomas. *Int J Mol Sci*. 18, 2017.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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. 実験的アプローチを用いたヒ素発がん性の証明とその機序の解明. 第106回日本病理学会総会、東京(2017年4月)
- 2) 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回日本毒理学学会学術年会、神奈川(2017年7月)
- 3) 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回日本毒理学学会学術年会、神奈川(2017年7月)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)

- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 鰐淵英機 . 芳香族アミンによる膀胱癌の臨床病理学的研究と AAOT の毒性、発がん性評価 . 第 45 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、山形 (2017 年 10 月)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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 . O-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)
- 16) 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