

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）

総括研究報告書

レポーター遺伝子導入動物を用いた
クロロプロパノール類の発がん機序の解明

研究代表者： 高須 伸二 （国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官）

研究要旨

1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP)は主に酸加水分解植物性たん白を原材料としたしょうゆ等の調味料の原材料やチーズ、穀物加工品など種々の食品に含まれる汚染物質である。1,3-DCPは肝臓および腎臓等に明確な発がん性を示すものの、遺伝毒性を含む発がん機序に関する情報は限定的である。本研究では、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性包括的検索モデル及び *gpt* ラットを用いた肝中期遺伝毒性・発がん性試験法（GPGモデル）による1,3-DCPの発がん機序の解明を目指す。研究初年度である平成30年度は、発がん用量における反復投与試験及びGPGモデルを実施するための用量設定試験を実施した。

遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルでは、6週齢の雄性 *gpt delta* ラットに1,3-DCPを27, 80および240 mg/Lの用量で13週間飲水投与した。その結果、実験期間中、何れの群においても死亡動物は認められず、一般状態の変化も認められなかった。実験期間中の体重推移について、1,3-DCP投与群と対照群間に有意な変化は見られなかった。投与終了後の器官重量を測定した結果、発がん標的臓器である肝臓及び腎臓の器官重量は1,3-DCP投与群において有意に増加し、用量依存的な変化が認められた。今後、発がん標的臓器を含む全身諸臓器の病理組織学的変化を精査することにより、1,3-DCPの毒性影響を明らかにする。さらに、肝臓及び腎臓を用いたレポーター遺伝子変異頻度解析を実施し、発がん標的臓器における遺伝毒性の関与を明らかにする。

GPGモデルでは、6週齢雄性F344ラットに1,3-DCPを25、50及び100 mg/kg体重の用量で28日間強制反復経口投与した。その結果、投与開始2日後に100 mg/kg体重群の全例が死亡あるいは切迫屠殺となった。25及び50 mg/kg体重群では実験期間を通して体重及び摂餌量に対照群と比して差はみられなかった。血液学的検査では25及び50 mg/kg体重群において貧血を示唆する赤血球系パラメータの変動がみられ、血清生化学的検査では50 mg/kg体重群においてアラントランスアミナーゼの上昇がみられた。25及び50 mg/kg体重群において肝臓の絶対及び相対重量の有意な上昇が認められた。病理組織学的検索では、100 mg/kg体重群の肝臓に重度な小葉中心性肝細胞壊死が認められ、死因は急性肝障害であると考えられた。また、100 mg/kg体重群では心臓、鼻腔及び腎臓に毒性影響が認められた。25及び50 mg/kg体重群の肝臓において肝細胞の単細胞壊死が小葉中心帯に認められた。ラット肝前腫瘍性病変マーカーであるglutathione S-transferase placental form (GST-P)免疫染色の結果、25及び50 mg/kg体重群の肝臓において典型的な前腫瘍性病変は認められなかったものの、小葉中心帯の肝細胞が陽性を示し、同部位ではKi67陽性肝細胞も多数みられたことから、GST-P発現と細胞増殖との関連が疑われた。また、25及び50 mg/kg体重群では鼻腔にも毒性影響が認められた。以上の結果により、GPGモデルの実施用量を50 mg/kg体重に決定した。

研究分担者：

松下 幸平(国立医薬品食品衛生研究所安全生物試験研究センター病理部・主任研究官)

A . 研究目的

食品中の化学物質による健康影響で発がん性は最も懸念すべきハザードの一つである。発がん性は主にげっ歯類を用いた長期間の試験で判断されるが、ヒトへの外挿性やリスク管理等の観点から、発がん機序、特に発がん過程に遺伝毒性が関与したかを明らかにすることは極めて重要である。一方、発がん性試験は多大な時間・動物数を必要とするため、迅速かつ効率的な評価の必要もある。このような背景のもと、我々はレポーター遺伝子導入動物を用いて遺伝毒性や発がん性を個体レベルで包括的に評価する試験法や一つの試験で迅速に検出する評価系を開発してきた。

食品中に含まれる可能性のあるクロロプロパノール類の一つである 1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP) は、主に酸加水分解植物性たん白を原材料としたしょうゆ等の調味料の原材料やチーズ、穀物加工品などに含まれることが知られている。1,3-DCP はラットにおいて、肝臓、腎臓、甲状腺、舌などで発がん性を示すことが報告されており、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA)では限られたデータながら肝毒性、腫瘍発生の増加が認められ、重大な健康影響は発がん性であるとしている。一方、摂取量推計の結果、高摂取群の推定摂取量とベンチマーク法を基にした暴露マージンの検討から、ヒトの健康への懸念は低いと評価している。また、食品安全委員会でも高摂取群における摂取量を比較した結果、日本人における健康への懸念は低いとしている。

しかしながら、1,3-DCP は *in vitro* 遺伝

毒性試験で明確な遺伝毒性を示すことが知られており、*in vivo* 遺伝毒性試験(ラット骨髄小核試験及びラット肝 UDS 試験)では陰性であるものの知見は限定的であり、腫瘍発生部位の作用機序に関する知見が不足していることから、JECFA では遺伝毒性による発がん作用機序を排除できないとしている。

本研究では 1,3-DCP についてレポーター遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性・発がん性試験モデルを用い、その発がん過程における遺伝毒性機序の関与を検討する。さらに、得られた結果に基づき分子病理学的な機序を検討し、1,3-DCP の発がん機序の解明を目指す。

B . 研究方法

B-1. *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルによる 1,3-DCP の発がん機序の解明

B-1-1. 試薬及び動物

1,3-DCP は Sigma-aldrich から購入した。動物は 5 週齢の雄性 Wistar 系 *gpt delta* ラットを日本エスエルシー株式会社から購入し、一週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24 ± 1 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時(オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 又は 3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、試験期間中は基礎食として固形 CRF1 を自由摂取させた。

B-1-2. 動物試験

6週齢の雄性 *gpt delta* ラット各群 10 匹に、1,3-DCP を発がん性試験における投与用量である 27, 80 及び 240 mg/L の用量で 13 週間飲水投与した。対照群には蒸留水を同様に投与した。投与期間中は一般状態を観察するとともに、体重を週 1 回測定した。投与終了後、剖検日前日より一晩絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、血清生化学的検査を実施した。剖検時に全身諸器官・組織を摘出し、脳、肺、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣に関しては重量の測定を行った。肝臓及び腎臓については、一部をレポーター遺伝子変異頻度解析のために -80℃ で保存した。

(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。

B-2. GPG モデルによる 1,3-DCP の遺伝毒性及び発がん性の検索

6週齢雄性 F344 ラットを 4 群 (n=5) に配し、1,3-DCP を 25, 50 及び 100 mg/kg 体重の用量で 28 日間強制反復経口投与し、対照群には蒸留水を同様に投与した。実験期間中に死亡が確認された動物については発見後速やかに解剖し、明らかな一般状態の悪化を示した動物についてはイソフルラン深麻酔下にて腹部大動静脈より放血安楽殺した。計画屠殺例については最終投与日の翌日にイソフルラン深麻酔下にて腹部大動脈から採血した後、腹部大動静脈より放血安楽殺し、血液サンプルは血液学的検査及び血清生化学的検査に供した。

全例について解剖時に全身諸臓器を採材して 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定し、さらに計画屠殺例の肝臓の一部を液体窒素で瞬間凍結して -80℃ で保存した。ホルマリン固定サンプルを用いて定法に従いパラフィン包埋・薄切し、HE 染色標本作製して病理組織学的検査を行った。また、発がん標的臓器である肝臓、腎臓、甲状腺及び舌については細胞増殖活性を評価するため Ki67 の免疫染色を実施し、肝臓についてはさらに細胞周期関連遺伝子の発現を real time RT-PCR 法にて解析した。肝臓においてアポトーシスの有無を検索するため cleaved-caspase 3 の免疫染色を実施するとともに、その機序を検討するためにウエスタンブロッティング法によりリン酸化 p53 及びリン酸化 extracellular signal-regulated kinase (ERK) の発現を解析した。また、肝臓における前腫瘍性病変を検索するため、ラット肝前腫瘍性病変マーカーである glutathione S-transferase placental form (GST-P) のタンパク質発現解析及び免疫染色を実施し、さらに *Gpst1* の遺伝子発現解析を行った。

(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。動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

C-1. *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルによる 1,3-DCP の発がん機序の解明

実験期間中、何れの群においても死亡動物は認められず、一般状態の変化も認めら

れなかった。実験期間中の体重推移について、1,3-DCP 投与群と対照群間に有意な変化は見られなかった。

投与終了後の器官重量を測定した結果、肝臓の絶対及び相対重量は用量依存的に増加し、何れの用量の投与群においても統計学的に有意な高値を示した。また、腎臓においても絶対及び相対重量の用量依存的な増加がみられ、80 mg/L以上の投与群において有意に増加した。肝臓及び腎臓以外の器官重量に関して有意な変化は認められなかった。

血清生化学的検査の結果、27 mg/L 以上の投与群において、アルカリホスファターゼの有意な低値が認められた。また、240 mg/L 投与群の総タンパク、アルブミン、グルコース及びカルシウムは対照群に比して有意に上昇した。

C-2. GPG モデルによる 1,3-DCP の遺伝毒性及び発がん性の検索

投与開始 2 日後に 100 mg/kg 体重群の 4 例が死亡、1 例が切迫屠殺となった。25 及び 50 mg/kg 体重群では実験期間を通して体重及び摂餌量に対照群と比して差はみられなかった。血液学的検査では 25 及び 50 mg/kg 体重群において赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球色素量及び平均赤血球色素濃度の有意な減少がみられ、網状赤血球数の有意な増加が認められた。血清生化学的検査では 50 mg/kg 体重群においてアラニントランスアミナーゼ (ALT) の有意な上昇がみられた。臓器重量の検索では、25 及び 50 mg/kg 体重群において肝臓の絶対及び相対重量の有意な上昇が認められた。

100 mg/kg 体重群の途中死亡及び切迫屠殺例の病理組織学的検索では、肝臓における重度な小葉中心性肝細胞壊死、心臓における心内膜及び心外膜下出血、鼻腔における重度な嗅上皮及び呼吸上皮の壊死、腎臓

における尿細管の壊死及び空胞化が認められた。25 及び 50 mg/kg 体重群において cleaved-caspase 3 陽性を示す肝細胞の単細胞壊死が小葉中心帯に認められたが、p53 及び ERK のリン酸化の亢進は認められなかった。また、25 及び 50 mg/kg 体重群では Ki67 陽性肝細胞が小葉中心帯において増加しており、遺伝子発現解析では細胞周期関連遺伝子の発現が有意に増加していた。Gstp1 の遺伝子発現及び GST-P のタンパク発現が 25 及び 50 mg/kg 体重群において上昇しており、GST-P 免疫染色では 25 及び 50 mg/kg 体重群の小葉中心帯において GST-P 陽性反応が認められたものの、典型的なラット肝前腫瘍性病変である GST-P 陽性細胞巣は観察されなかった。さらに、計画屠殺例の病理組織学的検査においては鼻腔における呼吸上皮の配列不整及び空胞化、腎臓における近位尿細管の硝子滴の減少が認められた。一方、腎臓、甲状腺及び舌における Ki67 陽性細胞数は投与群と対照群で差は認められなかった。

D. 考察

D-1. *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルによる 1,3-DCP の発がん機序の解明

本研究では、1,3-DCP についてレポーター遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性・発がん性試験モデルを用い、その発がん過程における遺伝毒性機序の関与を検討する目的で、*gpt delta* ラットに発がん用量の 1,3-DCP を 13 週間反復投与した。

その結果、肝臓及び腎臓の器官重量は 1,3-DCP 投与群において有意に増加し、用量依存的な変化が認められたことから、投与に起因する変化である可能性が考えられた。これまでに、ラットを用いた 1,3-DCP の発がん性試験において、雄では肝臓、腎臓、甲状腺及び舌に発がん性が認められることが報告されている。

今後、発がん標的臓器における病理組織学的変化を精査することにより、1,3-DCPの毒性影響を明らかにする。さらに、肝臓及び腎臓を用いたレポーター遺伝子変異頻度解析を実施し、発がん標的臓器における遺伝毒性の関与を明らかにする。

D-2. GPGモデルによる1,3-DCPの遺伝毒性及び発がん性の検索

100 mg/kg 体重群の死因は急性肝障害であることが示唆された。その他、100 mg/kg 群においては、鼻腔、心臓及び腎臓で毒性標的臓器あることが明らかとなった。

25 及び 50 mg/kg 体重群では、血液学的検査において赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量及び平均赤血球血色素濃度の減少がみられたことから、発現機序は不明であるものの貧血が生じているものと考えられた。

病理組織学的検査では肝臓、鼻腔、腎臓に1,3-DCP投与の影響がみられた。肝臓では肝細胞のアポトーシスがみられ、この発現機序には p53 及び ERK のリン酸化以外の因子が関与していることが示唆された。また、肝臓において前腫瘍性病変はみられなかったものの、小葉中心帯の肝細胞が GST-P に陽性を示し、Ki67 陽性細胞も主に小葉中心帯に位置していたことから、GST-P 発現と細胞増殖活性の亢進との関連が疑われた。鼻腔における呼吸上皮の配列不整及び空胞化がみられ、これらの変化は1,3-DCP投与による毒性影響であると考えられた。腎臓にみられた尿細管における硝子滴の減少は、肝臓における雄ラット特有の α_2u -グロブリンの産生の低下を反映しているものと考えられ、毒性学的意義は乏しいと判断した。

以上の結果に基づき、GPGモデルの投与用量を50 mg/kg 体重に決定した。

E. 結論

E-1. *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルによる1,3-DCPの発がん機序の解明

1,3-DCP についてレポーター遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性・発がん性試験モデルを用い、その発がん過程における遺伝毒性機序の関与を検討する目的で、*gpt delta* ラットに発がん用量の1,3-DCPを13週間反復投与した。その結果、肝臓及び腎臓の器官重量は1,3-DCP投与群において有意に増加し、用量依存的な変化が認められたことから、投与に起因する変化である可能性が考えられた。今後、発がん標的臓器における病理組織学的変化を精査することにより、1,3-DCPの毒性影響を明らかにする。さらに、肝臓及び腎臓を用いたレポーター遺伝子変異頻度解析を実施し、発がん標的臓器における遺伝毒性の関与を明らかにする。

E-2. GPGモデルによる1,3-DCPの遺伝毒性及び発がん性の検索

野生型 F344 ラットを用いた1,3-DCPの28日間反復投与実験により、1,3-DCPの毒性プロファイルを明らかにした。またGPGモデルの投与用量を50 mg/kg 体重に決定した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takasu S, Yokoo Y, Ishii Y, Kijima A, Ogawa K, Umemura T. Molecular pathological differences in global gene expression between two sustained proliferative lesions, nodular

- regenerative hepatocellular hyperplasia and hepatocellular adenoma, in mice. *Toxicol Pathol* 2019, 47(1):44-52.
- 2) Tsuchiya T, Kijima A, Ishii Y, Takasu S, Yokoo Y, Nishikawa A, Yanai T, Umemura T. Mechanisms of oxidative stress-induced *in vivo* mutagenicity by potassium bromate and nitrofurantoin. *J Toxicol Pathol* 2018, 31(3):179-188.
 - 3) Tsuchiya T, Kijima A, Ishii Y, Takasu S, Yokoo Y, Nishikawa A, Yanai T, Umemura T. Role of oxidative stress in the chemical structure-related genotoxicity of nitrofurantoin in *Nrf2*-deficient *gpt* delta mice. *J Toxicol Pathol* 2018, 31(3):169-178.
 - 4) Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with o-toluidine and o-anisidine. *Archives of toxicology* 2019, doi: 10.1007/s00204-019-02396-8. [Epub ahead of print]
 - 5) Sone M, Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Morikawa T, Nishikawa A, Ogawa K. Immunohistochemistry of γ -H2AX as a method of early detection of urinary bladder carcinogenicity in mice. *Journal of applied toxicology*. 2019, doi: 10.1002/jat.3775. [Epub ahead of print]
 - 6) Matsushita K, Takasu S, Kuroda K, Ishii Y, Kijima A, Ogawa K, Umemura T. Mechanisms underlying exacerbation of osmotic nephrosis caused by pre-existing kidney injury. *Toxicological sciences*, 2018, 165 (2), 420-430.
 - 7) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Takahashi M, Inoue K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-ethylbutanal in F344 rats. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 2018, 100, 118-126.
 - 8) Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of applied toxicology*. 2018, 38 (4), 537-543.
 - 9) Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of acetaminophen using an obese rat model. *The Journal of toxicological sciences*. 2018, 43 (7), 423-433.
- ## 2. 学会発表
- 1) 高須伸二, 中村くるみ, 石黒結唯, 石井雄二, 木島綾希, 小川久美子, 梅村隆志: ラット肝臓における GST-P 陽性巣の種々発がん物質休薬後動態の検討: 第 35 回日本毒性病理学会学術集会. 2019 国内.
 - 2) 中村賢志, 木島綾希, 石井雄二, 高須伸二, 小川久美子, 梅村隆志: F344 ラットを用いた 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal の 90 日間反復投与毒性試験: 第 35 回日本毒性病理学会学術集会. 2019 国内.
 - 3) 石井雄二, 菊池玲美花, 木島綾希, 高須伸二, 小川久美子, 梅村隆志: F344 ラットを用いたアセタミドの 28 日間反復投与による肝毒性評価: 第 35 回日本毒性病理学会学術集会. 2019 国内.
 - 4) 石井雄二 時亮, 高須伸二, 木島綾希, 能美健彦, 小川久美子, 梅村隆志: *gpt* delta ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験と網羅的 DNA 損傷解析によるエレミシンの肝発がん機序の解

- 明:日本環境変異原学会第47回大会, 2018 国内.
- 5) 1, 3-Dichloro-2-propanol の F344 ラットを用いた 28 日間反復強制経口投与による毒性プロファイルの検索 松下幸平, 豊田武士, 森川朋美, 山田貴宣, 小川久美子, 第 35 回日本毒性病理学会学術集会, 2019/02/01, 国内.
 - 6) 膀胱発がん物質投与初期における遺伝子発現解析および新規膀胱発がんマーカーの探索 豊田武士, 山田貴宣, 松下幸平, 森川朋美, 小川久美子, 第 35 回日本毒性病理学会学術集会, 2019/02/01, 国内.
 - 7) 膀胱発がん物質投与による γ -H2AX 形成の用量相関性及び経時的変化 山田貴宣, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小川久美子, 第 35 回日本毒性病理学会学術集会, 2019/02/01, 国内.
 - 8) RNA アプタマーを用いた新規骨再生用材料の *in vivo* 性能評価 野村祐介, 藤澤彩乃, 松下幸平, 豊田武士, 福井千恵, 森下裕貴, 小川久美子, Chung Ungil, 中村義一, 齋島由二, 第 40 回日本バイオマテリアル学会, 2018/11/12, 国内.
 - 9) 膀胱発がん性芳香族アミン *o*-toluidine の代謝物分析と DNA 付加体 田島悠也, 豊田武士, 平山裕一郎, 橋詰力, 松下幸平, 小川久美子, 渡辺賢二, 戸塚ゆ加里, 若林敬二, 三好規之, 第 47 回日本環境変異原学会大会, 2018/11/01, 国内.
 - 10) ラットを用いた 2-エチルブタナールの 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験 森川朋美, 松下幸平, 豊田武士, 山田貴宣, 高橋美和, 井上薫, 小川久美子, 第 24 回日本食品化学学会, 2018/05/17, 国内.
 - 11) 膀胱がんリスク因子としてのノルハルマン代謝物:ラットを用いた検討, 豊田武士, 戸塚ゆ加里, 松下幸平, 森川朋美, 山田貴宣, 三好規之, 若林敬

二, 小川久美子, 第 25 回がん予防学術大会, 2018/06/27, 国内.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む.)

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