

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）

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

分担研究報告書

*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の肝発がん機序の解明

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

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おり、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いる。また、1,3-DCP は *in vitro* 遺伝毒性試験で遺伝毒性を示すことが知られているものの、*in vivo* における遺伝毒性試験の知見は限定的であり、発がん標的臓器における発がん機序、特に遺伝毒性の関与についてはあまり検討されていない。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て、発がん過程における遺伝毒性機序の関与を検討する。6週齢の雄性 *gpt delta* ラットに 1,3-DCP を 27, 80 及び 240 mg/L の用量で 13 週間飲水投与した。投与終了後、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。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。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。

A．研究目的

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、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、我々がこれまで開発してきた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て、1,3-DCP 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. 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。動物の飼育はバリエーション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-2. 動物試験

6 週齢の雄性 *gpt delta* ラット各群 10 匹に配し、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。

C．研究結果

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（Figure 1）。

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（Table 1）。

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（Table 2）。

D．考察

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。

E．結論

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、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。

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) 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.

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 .

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

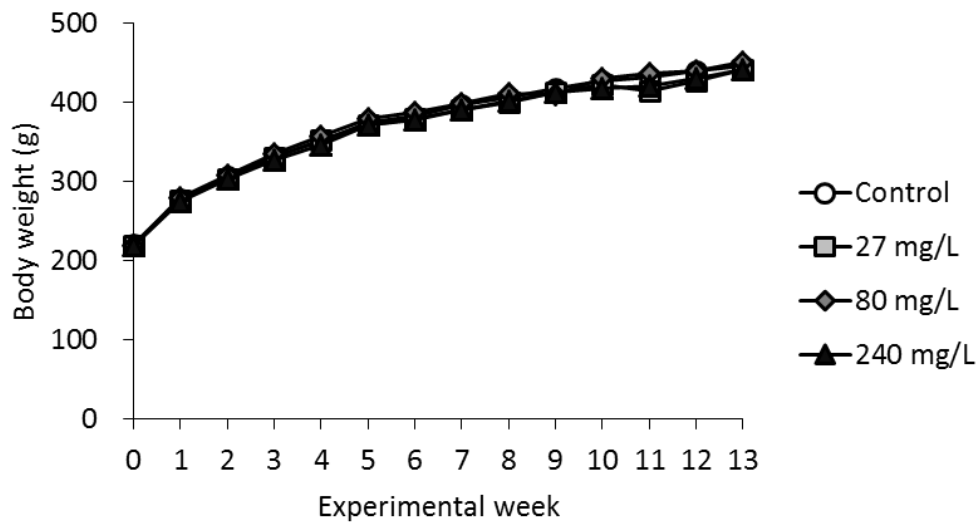


Figure 1. Body weights of male *gpt delta* rats treated with 1,3-DCP for 13 weeks.

Table 1. Final body weight and organ weight data for male *gpt* delta treated with 1,3-DCP for 13 weeks.

	Control	27 mg/L	80 mg/L	240 mg/L
Final body weights (g)	437 ± 33	429 ± 30	437 ± 58	431 ± 30
Organ weights				
Absolute weights (g)				
Brain	2.05 ± 0.05	2.05 ± 0.03	2.06 ± 0.05	2.08 ± 0.07
Lungs	1.28 ± 0.10	1.24 ± 0.12	1.28 ± 0.07	1.33 ± 0.14
Heart	1.09 ± 0.10	1.09 ± 0.07	1.08 ± 0.07	1.12 ± 0.10
Thymus	0.27 ± 0.03	0.26 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.26 ± 0.05
Liver	9.27 ± 0.81	10.39 ± 0.80 *	11.82 ± 1.47 **	14.20 ± 1.22 **
Kidneys	2.28 ± 0.15	2.38 ± 0.15	2.52 ± 0.17 *	2.75 ± 0.22 **
Spleen	0.67 ± 0.08	0.65 ± 0.06	0.73 ± 0.06	0.70 ± 0.09
Adrenals	0.053 ± 0.008	0.051 ± 0.008	0.052 ± 0.005	0.052 ± 0.006
Testes	3.88 ± 0.19	3.90 ± 0.12	3.88 ± 0.48	3.80 ± 0.62
Relative weights (g/100g b.w.)				
Brain	0.47 ± 0.03	0.48 ± 0.03	0.48 ± 0.06	0.48 ± 0.03
Lungs	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.31 ± 0.03
Heart	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.01
Thymus	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Liver	2.12 ± 0.09	2.42 ± 0.09 **	2.71 ± 0.12 **	3.30 ± 0.18 **
Kidneys	0.52 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.58 ± 0.05 **	0.64 ± 0.03 **
Spleen	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.01
Adrenals	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.002
Testes	0.89 ± 0.05	0.91 ± 0.05	0.90 ± 0.11	0.89 ± 0.16

*, **: Values are significantly different from control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

Table 2. Serum biochemistry for male *gpt delta* treated with 1,3-DCP for 13 weeks.

		Control	27 mg/L	80 mg/L	240 mg/L
TP	(g/dL)	6.0 ± 0.2	6.2 ± 0.2	6.2 ± 0.1	6.6 ± 0.3 **
A/G		2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.2
Alb	(g/dL)	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.5 ± 0.2 **
T. Bil	(mg/dL)	0.068 ± 0.015	0.057 ± 0.013	0.056 ± 0.010	0.059 ± 0.013
Glu	(mg/dL)	135 ± 22	143 ± 18	150 ± 23	161 ± 25 *
TG	(mg/dL)	54 ± 21	67 ± 30	81 ± 45	80 ± 50
T. Cho	(mg/dL)	64 ± 13	67 ± 7	64 ± 9	86 ± 18
PL	(mg/dL)	107 ± 13	112 ± 8	111 ± 12	141 ± 25
BUN	(mg/dL)	16.3 ± 2.2	16.4 ± 1.3	15.7 ± 2.2	14.7 ± 2.1
CRN	(mg/dL)	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.02
Ca	(mg/dL)	10.0 ± 0.2	10.0 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.3 ± 0.3 **
P	(mg/dL)	5.8 ± 0.5	5.5 ± 0.4	5.8 ± 0.5	6.0 ± 0.7
Na	(mEq/dL)	144.0 ± 1.3	143.7 ± 1.1	142.8 ± 1.0	143.4 ± 1.1
K	(mEq/dL)	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.3	4.6 ± 0.2
Cl	(mEq/dL)	103.3 ± 1.3	103.4 ± 1.6	102.6 ± 0.8	102.4 ± 1.3
AST	(IU/L)	87 ± 15	67 ± 6	70 ± 8	65 ± 8
ALT	(IU/L)	38 ± 6	35 ± 7	28 ± 4	29 ± 3
ALP	(IU/L)	248 ± 58	221 ± 32 **	194 ± 48 **	171 ± 27 **
γ-GT	(IU/L)	<3	<3	<3	<3

*, **: Values are significantly different from control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

TP, total protein; A/G, albumin/globulin ratio; Alb, albumin; T. Bil, total bilirubin; Glu, glucose; TG, triglyceride; T. Cho, total cholesterol; PL, phospho lipid; BUN, blood urea nitrogen; CRN, creatinine; Ca, calcium; P, inorganic phosphorus; Na, sodium; K, potassium; Cl, chloride; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; γ-GT, γ-glutamyl aminotransferase.