

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*ラットを用いた中期発がん評価系による1, 3-dichloro-2-propanolの
遺伝毒性および発がんプロモーション作用の検索

研究分担者： 松下 幸平（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 は肝臓及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* ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法により、1, 3-DCP の遺伝毒性及び発がんプロモーション作用について検索することを目的とした。

本年度は、野生型 F344 ラットを用いた 28 日間反復経口投与実験を実施し、中期遺伝毒性・発がん性試験法の至適投与用量を決定するとともに、1, 3-DCP の毒性プロファイルを検索した。

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对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ニ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、*gpt delta* ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法の投与用量を 50 mg/kg 体重に決定した。

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、発がん性

の有無のみならず発がんの機序、特に発がん過程に遺伝毒性が関与したかを検討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

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。

クロロプロパノール類はプロパノールに塩素が結合した物質の総称であり、酸加水分解植物性たん白を製造する際に副生する。なかでも、3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD)と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。FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA)では、3-MCPDについては生体内で遺伝毒性は認められないとして、腎臓の尿管過形成を毒性指標として暫定最大一日耐容摂取量を設定している。一方、1, 3-DCP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が、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、JECFAでは*in vitro* 遺伝毒性試験では明確な遺伝毒性があり、2種の*in vivo* 遺伝毒性試験では陰性であるものの限定的であること、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、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。

以上より、本試験では1, 3-DCPについてレポーター遺伝子導入動物を用いた中期遺伝毒性・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。

平成30年度は中期遺伝毒性・発がん性試験法の至適投与用量を設定するとともに、1, 3-DCPの毒性プロファイルを検討する目的で、野生型F344ラットを用いた

1, 3-DCPの28日間強制反復経口投与試験を実施した。

B. 研究方法

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

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对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、平均赤血球血色素量及び平均赤血球血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对照群で差は認められなかった。

D. 考察

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、発生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 2 μ -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, *gpt delta* ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法の投与用量を 50 mg/kg 体重に決定した。

E . 結論

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 *gpt delta* ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法の投与用量を 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) 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]
- 2) 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]
- 3) 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.

- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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) 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。
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) 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．

- 5) 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．
- 6) 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．
- 7) 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