

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 30 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 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 准教授

研究要旨

本研究は化学物質の有害性評価の迅速化・高精度化・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確立および検証を行った。本年度に遺伝毒性ラット肝発がん物質 4 種類及びそれ以外の物質 6 種類（非遺伝毒性ラット肝発がん物質 5 種類と遺伝毒性非発がん物質 1 種類）をラットに単回投与し、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、「陽性」と判定されたものは 1 物質であり、それは遺伝毒性肝発がん物質であった。また、それ以外の物質はすべて「陰性」と判定された。以上の結果から、本肝発がん性予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を高い特異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、このシステムで得られた結果は国民生活の安全・安心を保証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。

本研究の意義は、成果となる発がん性評価法及びガイドラインが、化学物質の有害性評価において汎用的に用いられかつ厚生労働行政施策の科学的基盤となることであり、得られた発がん性に関する情報は厚生労働行政施策への活用が非常に期待できる。また、得られる成果は国内のみならず、化学物質の安全性評価に係る国際的な試験法やガイドライン等への活用

も期待される。

平成 30 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、4 種類の遺伝毒性ラット肝発がん物質及び 6 種類のそれ以外の物質（非遺伝毒性ラット肝発がん物質 5 種類と遺伝毒性非発がん物質 1 種類）遺伝毒性ラット肝発がん物質について、ラット単回投与と試験を行い、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 10 種類について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。実験動物は 6 週齢の雄 SD ラットを用いた。動物試験プロトコールは事前に共有・配布し、プロトコールに従い試験を実施した。被験物質と投与濃度は（各物質の LD50 の 1/3）表 1 の通りである。

被験物質投与後 24 時間後に剖検を行った。肝臓を摘出し、RNA 抽出用として、外側左葉(LL)を摘出後、下端辺縁部を約 2cm × 0.5cm の大きさで 2 スライス切り出し、それぞれ 1mL の RNA later が入った 1.5mL チューブに移した（合計 2 本、そのうち 1 本は、他施設でのバリデーション用）、1.5mL チューブを 4℃ で一晩保管後、-80℃ で長期保管した。凍結保存サンプル用として、外側左葉の上半分を 1.5ml チューブ 2 本分採取し、液体窒素により凍結後、-80℃ 凍結保管した（1 本は DNA adduct 解析用）。ホルマリン固定用サンプルとして、外側左葉の下半分、内側右葉(RM)及び右葉尾部(R2)から計 3 スライス切り出し、カセットに入れ 10%ホルマリンにて固定した。

遺伝子発現については、リアルタイム PCR にてデータを取得した。リアルタイム RT-PCR は施設共通のプロトコールに従って行った。肝臓からの total RNA 抽出と cDNA の合成はそれぞれ RNeasy mini kit（キアゲン）

と Super Script VI VIL0 Maste Mix(invitrogen) のキットを使用した。

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的アルゴリズムによるモデル) に入力し、陽性または陰性の判定を行った。

(倫理面への配慮)

大阪市立大学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

qPCR 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、遺伝毒性ラット肝発がん物質を「陽性」、その他の物質 (非遺伝毒性ラット肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質) を「陰性」と判定する。その結果、「陽性」と判定されたものは 1 物質であり、それは遺伝毒性肝発がん物質であった。また、それ以外の物質はすべて「陰性」と判定された。

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(+) 肝発がん性(+)	2-Nitropropane (2-NP) (陽性対照物質)	240	Positive
	Vinyl bromide (VB)	170	Negative
	Dichloroacetic acid (DCA)	940	Negative
	Hydrazine sulfate (HS)	200	Negative
	Acid Red 26 (AR-26)	2000	Positive
Ames(-) 肝発がん性(+)	Hexachlorobenzene (HCB)	2000	Negative
	Carbon tetrachloride (CCL4)	780	Negative
	Gemfibrozil (GFZ)	470	Negative
	Ethinylestradiol (EE)	320	Negative
	Coumarin	100	Negative
Ames(+) 発がん性(-)	Isoniazid (INH)	420	Negative

D . 考察

非遺伝毒性ラット肝発がん物質及び遺伝毒性非発がん物質の合計 6 物質はすべて陰性と判定されたことから、本モデルは遺伝毒性肝発がん物質を高い特異度で検出できる可能性が示唆された。一方で、遺伝毒性肝発がん物質 4 物質のうち、3 物質が偽陰性となった。今後、検出精度を上げるには偽陰性物質について最大耐量を用いて再評価する必要があると考えられる。

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特異度で検出できる可能性が示唆された。今後も本試験系の検出限界や改良についての検証を引き続き行う必要がある。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, Wanibuchi H. Acetoaceto-o-toluidide enhances cellular

proliferative activity in the urinary bladder of rats. Toxicol Sci. 2019, in press.

- 2) Okuno T, Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. mTOR Activation in Liver Tumors Is Associated with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Both Mouse Models and Humans. Cancers (Basel). 2018; 10: 465.
- 3) Gi M, Fujioka M, Yamano S, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Yamaguchi T, Tago Y, Kitano M, Hayashi SM, Wanibuchi H. Chronic dietary toxicity and carcinogenicity studies of dammar resin in F344 rats. Arch Toxicol. 2018; 92: 3565-83.
- 4) Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. In vivo positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats. Arch Toxicol. 2018; 92: 3207-21.
- 5) Fukushima S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Matsumoto M. Quantitative Approaches to Assess Key Carcinogenic Events of Genotoxic Carcinogens. Toxicol Res. 2018; 34: 291-6.
- 6) Shimizu Y, Tamada S, Kato M, Takeyama Y, Fujioka M, Kakehashi A, Nakatani T, Wanibuchi H, Gi M. Steroid sulfatase promotes invasion through epithelial-mesenchymal transition and predicts the progression of bladder cancer. Exp Ther Med. 2018; 16: 4463-70.

2. 学会発表

- 1) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、鰐淵英機 . 職業性胆管がんにおける疫学のおよび動物モデルでの知見 . 第 25 回日本がん予防学会学術総会、香川 (2018 年 6 月)
- 2) 魏民、藤岡正喜、奥野高裕、行松直、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機 . ラットにおける 1,4-dioxane の変異原性と発がん性の定量的解析 . 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月)
- 3) 魏民、藤岡正喜、行松直、奥野高裕、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機 . BBN 誘発マウス膀胱がんモデルにおける Acetazolamide の予防効果の検討 . 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都 (2019 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